

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-527101

(P2001-527101A)

(43) 公表日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 8 G 63/06		C 0 8 G 63/06	4 B 0 6 4
A 6 1 K 47/34		A 6 1 K 47/34	4 C 0 7 6
A 6 1 L 17/00		A 6 1 L 17/00	4 C 0 8 1
26/00		27/00	U 4 F 0 7 4
27/00		31/00	4 J 0 0 2
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-525470 (P2000-525470)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月22日 (1998. 12. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年6月15日 (2000. 6. 15)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 2 7 3 5 5
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 3 2 5 3 6
 (87) 国際公開日 平成11年7月1日 (1999. 7. 1)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 6 8 , 4 5 5
 (32) 優先日 平成9年12月22日 (1997. 12. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 メタボリックス、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02142-1196, ケンブリッジ, サード ス
 トリート 303, 2 エヌディー フロアー
 (72) 発明者 マーティン, デイビッド ビー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02474, アーリントン, ヘムロック
 ストリート 33
 (72) 発明者 スカラリー, フランク エイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02215, ボストン, ベイ ステイト
 ロード 39, アパートメント 5
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制御された分解速度を有するポリヒドロキシアлкаノエート組成物

(57) 【要約】

制御された分解速度を有する生体適合性ポリヒドロキシアлкаノエート組成物 (特に、生物工学的に製造された4-ヒドロキシ酪酸のホモ-およびコポリマーをベースとしたもの) が開発された。1つの実施態様において、ポリヒドロキシアлкаノエートは、分解速度を変化させるために添加剤 (例えば、増孔剤) を含む。別の実施態様において、ポリヒドロキシアлкаノエートは、その分解速度を変化させるために、モノマーの混合物から形成され、あるいはその骨格にペンダント基または修飾を含む。さらに別の実施態様において、ポリヒドロキシアлкаノエートは、化学的に改変される。多孔性または露出される表面積を増加するデバイスを生産する方法は、分解性を変えるために使用され得る。実施例に示されるように、これらのポリヒドロキシアлкаノエート組成物は、極めて好ましい機械的特性を有し、生体適合性であり、生理学的条件下で所望される時間の枠内で分解する。これらのポリヒドロキシアлкаノエート材料は、現在入手可能であるものよりも幅広い範囲のポリヒドロキシアлкаノエート分解速度を与える。これらの材料を処

置する方法 (特に、治療的、予防的、または診断的応用)、あるいはインプラントされ得るまたは注入され得るデバイス内にこれらの材料を処置する方法がまた、記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体適合性ポリヒドロキシアルカノエート処方物であって、これは、生理学的な条件下で1年未満の制御された分解速度を有し、以下：エステル結合に加えてヘテロ原子がポリマーの骨格鎖中に取りこまれるポリマー骨格の、化学的安定性を変化させる1以上のユニットを含む、ポリヒドロキシアルカノエート；ポリマー骨格の分解を触媒するペンダント基を含む、ポリヒドロキシアルカノエート；ポリヒドロキシアルカノエートの化学的安定性を変化させる添加剤を含む、ポリヒドロキシアルカノエート処方物；および増孔剤を含む、ポリヒドロキシアルカノエート処方物、の群から選択される、生体適合性ポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項2】 前記ポリマー骨格の前記化学的安定性を変化させる1以上のユニットを含む、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項3】 前記別のユニット（単数または複数）の存在が鎖の切断を促進する、請求項2に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項4】 前記ユニットが2より多い官能基を含む、請求項2に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項5】 前記エステル結合に加えてヘテロ原子が前記ポリマー骨格鎖に取りこまれる、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項6】 前記ヘテロ原子が酸素、イオウまたは窒素からなる群から選択される、請求項5に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項7】 前記ユニットがエステル、エーテル、カルバメート、無水物、およびカルボネートからなる群から選択される化学結合を有する前記ポリマー骨格に取りこまれる、請求項2に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項8】 前記ユニットが2-ヒドロキシ酸；2-ヒドロキシアルコキシ酢酸；二塩基酸；トリオール；およびテトラオールからなる群から選択される、請求項2に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項9】 前記2-ヒドロキシ酸が2-ヒドロキシアルカン酸である、請求項8に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項10】 前記2-ヒドロキシアルカン酸が乳酸である、請求項9に

記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項11】 前記2-ヒドロキシアルカン酸がグリコール酸である、請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項12】 前記2-ヒドロキシ酸が2-ヒドロキシアルケン酸である、請求項8に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項13】 前記2-ヒドロキシアルコキシ酢酸が2-ヒドロキシエトキシ酢酸および3-ヒドロキシプロポキシ酢酸からなる群から選択される、請求項8に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項14】 前記ポリマー骨格の前記分解を触媒するペンダント基を含む、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項15】 前期ペンダント基が酸性基および塩基性基から選択される、請求項14に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項16】 ポリマー鎖の切断を引き起こす反応物ペンダント基を含む、請求項14に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項17】 前記反応物ペンダント基が求核剤および求電子剤から選択される、請求項16に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項18】 前記ペンダント基がアルコール、酸およびアミン基からなる群から選択される、請求項14に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項19】 前記ポリヒドロキシアルカノエートの前記化学的安定性を変化させる添加剤を含む、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項20】 前記添加剤が鎖の切断を促進する、請求項19に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項21】 前記添加剤が酸、塩基、求電子剤、求核剤、可塑剤、ポリマー、増孔剤、およびポリマーの結晶性を減少するように設計された試薬からなる群から選択される、請求項19に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項22】 増孔剤を含む、請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノ

エート処方物。

【請求項23】 前記増孔剤が凍結乾燥し得る粒子である、請求項22に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項24】 前記増孔剤が水を吸収する、請求項22に記載のポリヒドロキシアルカノエート処方物。

【請求項25】 請求項1～24のいずれか1つのポリヒドロキシアルカノエート処方物を含む、必要とする患者にインプラントまたは注入するための、生体適合性ポリマー性デバイス。

【請求項26】 適切な基質を伴う、バクテリアの発酵によって請求項1～18のいずれか1のポリヒドロキシアルカノエート処方物を調製するための、方法。

【請求項27】 ポリヒドロキシアルカノエートを分解改変剤で処方することによって、請求項19～24のうちのいずれか1つのポリヒドロキシアルカノエート処方物を調製するための、方法。

【請求項28】 酵素的または化学的合成によって、請求項1～18のうちのいずれか1つのポリヒドロキシアルカノエート処方物を調製するための、方法。

【請求項29】 熔融プロセッシングまたは反応性混合によって、請求項1～24のうちのいずれか1つのポリヒドロキシアルカノエート処方物を調製するための、方法。

【請求項30】 ポリヒドロキシアルカノエート処方物に対する酵素を発現する組換え生物体に、適切な基質または試薬を加えることによって、請求項1～18のうちのいずれか1つのポリヒドロキシアルカノエート処方物を調製するための、方法。

【請求項31】 前記組成物がコフィード (c o - f e e d) を使用する発酵によって導かれる、請求項26に記載の方法。

【請求項32】 前記発酵プロセスが遺伝子組換えバクテリアを使用する、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 前記化学的合成が、挿入、エステル交換反応、および／ま

たはエステルメタセシスを包含する、請求項28に記載の方法。

【請求項34】 医療用デバイスを作製するための、請求項1～24のうちのいずれか1つのポリヒドロキシアルカノエート処方物の、使用。

【請求項35】 前記ポリヒドロキシアルカノエート処方物が、溶媒キャストリング、溶融処理、繊維処理、繊維紡績、繊維織り込み、押出し成形、射出成形、圧縮鋳型成形、ラミネーション、および粒子成形からなる群から選択されるプロセスを使用して処理される、請求項34に記載の使用。

【請求項36】 組織工学での使用のための、請求項25に記載のデバイス。

【請求項37】 制御された薬物送達での使用のために治療的試薬を含む、請求項25に記載のデバイス。

【請求項38】 超音波、MRI、CAT、X線、および蛍光からなる方法によって検出可能な試薬の群から選択されるイメージング試薬を含む、請求項25に記載のデバイス。

【請求項39】 成形外科的適用での使用のための、請求項25に記載のデバイス。

【請求項40】 前記デバイスが多孔性である、請求項25に記載のデバイス。

【請求項41】 微粒子の形態である、請求項25に記載のデバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般的にポリヒドロキシアルカノエートポリマーおよびその分解速度を変化させる方法（特に、このプロセスを促進する方法）および特に医療用に適する新規な生分解性ポリヒドロキシアルカノエートに関する。

【0002】

(発明の背景)

医療用分野において、インビボで数週間または2～3か月で各々のモノマーに分解する多くの分解性ポリマーが開発された。これらの合成分解性ポリマーの有効性にもかかわらず、利用可能な選択肢の範囲をさらに拡大し得る分解性ポリマーを開発する必要が依然としてある。特に、より広い範囲の機械的特性を提供する分解性ポリマーを開発する必要がある。

【0003】

ポリヒドロキシアルカノエートは、天然の、熱可塑性ポリエステルであり、消費者包装、使い捨てオムツのライニングおよびごみ袋、食品および医療品を含む、莫大に多様な適用分野での使用のために、伝統的なポリマー技術によって処理され得る。初期の努力は、成形する適用（特に、消費者包装の品目（例えば、ビン、化粧用容器、ペン、ゴルフのティーなど））に焦点が当てられた。米国特許第4,826,493号および同第4,880,592号は、PHBおよびPHBVフィルム生産およびオムツのバックシートとしての使用を記載する。米国特許第5,292,860号は、PHAコポリマーであるポリ(3-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシヘキサノエート)の生産ならびにこれらのポリマーの使用（オムツのバックシートフィルムおよび他の使い捨て品目を作製するため）を記載する。オムツのバックシート材料および他の材料（PHBV以外のPHBコポリマーから生分解性またはコンポスト化可能な個人衛生品を生産するため）は、PCT WO 95/20614、WO 95/20621、WO 95/23250、WO 95/20615、WO 95/33874、US 5,502,116、US 5,536,564、US 5,489,470

およびW O 9 6 / 0 8 5 3 5 に記載される。

【0004】

P H A の最も役に立つ性質のうちの1つ（これは石油化学から誘導されたポリマーとこれらとを容易に区別する）は、その生分解性である。土壌中のバクテリアにより天然に生産される場合、P H A は、土壌、堆肥、または海の堆積物中のこれらと同じバクテリアに引き続き曝露されると分解される。P H A の生分解性は、環境中の微生物の活性および品目の表面積などの多くの因子に依存する。加えて、温度、p H、分子量および結晶化度が重要な因子である。生分解は、微生物が可塑物の表面上で増殖し始め、ポリマーをヒドロキシ酸モノマーユニットに分解する酵素を分泌するときに始まる。それから、ヒドロキシ酸は、微生物によって摂取され、増殖のための炭素源として使用される。好気的な環境では、このポリマーは二酸化炭素および水に分解され、嫌気的な環境では分解生成物は二酸化炭素およびメタンである（W i l l i a m s , S . F . および P e o p l e s , O . P . , C H E M T E C H , 2 6 , 3 8 - 4 4 (1 9 9 6) ）。環境中における P H A の分解のメカニズムは、酵素的な攻撃を経由すると広く考えられており、比較的速いものであり得るが、一方、インビボでの分解のメカニズムは、一般的に、ポリマーのエステル結合上を単純に加水分解的に攻撃することを含むことが理解される。これは、媒介されるタンパク質があり得るかまたはあり得ない。ポリグリコール酸およびポリ乳酸のような2-ヒドロキシ酸を含むポリマーとは異なり、ポリヒドロキシアルカノエートは、通常3-ヒドロキシ酸を、特定の場合では、4、5および6-ヒドロキシ酸をさえ含む。これらのヒドロキシ酸から誘導されるエステル結合は、一般的に、2-ヒドロキシ酸から誘導されたエステル結合よりも加水分解を受けにくい。

【0005】

研究者たちは、非常に多種類の P H A の生産方法を開発し、約100の異なるモノマーが制御された発酵条件下でポリマーに取り込まれた（S t e i n b u c h e l , A . および V a l e n t i n , H . E . , F E M S M i c r o b i o l . , L e t t . , 1 2 8 : 2 1 9 - 2 2 8 (1 9 9 5) ）。現在2つだけ市販の P H A 組成物、ポリ-（R）-3-ヒドロキシブチレート（P H B）およびポ

リー(R)-3-ヒドロキシブチレート-co-(R)-3-ヒドロキシバレレート(PHBV)がある。その大きな組成上の多様性のために、物理的性質の範囲でPHAは、作製され得る(Williams, S. F. およびPeoples, O. P., CHEMTECH, 26, 38-44(1996))。市販のPHA、PHBおよびPHBVは、PHAで得られ得る性質一式のうちの小さな成分だけを示す。例えば、PHBおよびPHBVの破断時伸び率は、約4~42%にわたるが、ポリ-4-ヒドロキシブチレート(P4HB)に対する同じ性質は、約1000%である(Saito, Y. およびDoi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16:99-104)。同様に、PHBおよびPHBVに対するヤング率および引っ張り強さの値は、それぞれ3.5~0.5GPaおよび40~16MPa(25モル%に増加するHV量に対して)であるのに比較して、P4HBに対してそれぞれ、149MPaおよび104MPaである(Saito, Y. およびDoi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16:99-104)。

【0006】

合成汎用(commodity)樹脂に対する生分解性代替物として商業用途を見つけることに加えて、PHBおよびPHBVは、医用の応用に使用するために広範に研究された。これらの研究は、制御放出における潜在性を有する使用(Koosha, F. ら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:117-130(1989)およびPouton, C. W. およびAkhtar, S., Adv. Drug Delivery Rev., 18:133-162(1996)によって総説が書かれた)から、錠剤の処方物、外科的縫合、傷用の包帯、潤滑パウダー、血管、組織の骨格、管状身体部位を結合するための外科的インプラント、骨折固定板、および他の整形的使用(Metabolixにより、WO 98/51812に記載される)における使用までに及ぶ。おそらく、最も進歩した医療用開発は、損傷した軟部組織において、組織分離および組織再生の刺激のための多孔性生物再吸収可撓性シートを調製するために、PHBおよびPHBVを使用することである(欧州特許出願754467A1(Bowald, S. およびJohansson-Ruden, G

1988年6月26日出願) ならびにEP 0349505 A2に記載される)。最近の報告はまた、持続細胞増殖へのPHBVの使用を記載した(Rivard, C. H. ら、J. Appl. Biomater.、6:65-68(1995))。

【0007】

生体適合性に加えて、インプラントされた医療用デバイスが、第一の機能が満たされた後に分解すべきであることがしばしば望まれる。PHBおよびPHBV(現在まで医療用インプラントとしてPHAだけが試験される)は、非常に長いインビボ分解期間(PHBに対して1年より長い)を示した(Duvernoy, O., Malmら、Thorac. Cardiovasc. Surgeon(1995)43:271-74、Malmら、C. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.(1992)104:600-607)。多くの適用に対して、この非常に長い分解時間は、創傷治療部位のポリマーの残留が患者に慢性炎症反応をもたらし得るので、望ましくない。動脈組織を再生するために使用される、ゆっくりと分解するPHBパッチは、長期間(2年より長い)マクロファージ応答を誘発することが見出された(Malmら、Eur. Surg. Res. 1994、26:298-308)。マクロファージはPHBインプラントの分解に関与することが確認された。この長期間のマクロファージ応答は、インプラントに由来する、持続的なゆっくりとした分解をする粒子性材料の存在を示すようである。確かに、心膜の修復に使用されるPHBパッチは、12か月の埋め込みの後に普通の光学顕微鏡では見えなかったが、小さな残渣の粒子性材料は、偏光顕微鏡で観測された(Malmら、C. Scand. J. Thor. Cardiovasc. Surg. 1992、26:9-14)。この粒子性材料がインプラントした部位に局在化したままであるか、または身体中を移動し得て、不測の合併症を引き起こすかは、明らかではない。生物学的運命(すなわちこの粒子性材料の医学的影響)は、長期間の研究なしでは予測され得ない。ゆっくりと分解するPHAに付随する潜在的な問題を最小化するために、より速いインビボ分解速度を有する、再吸収可能な材料を利用することは利点がある。

【0008】

医療の応用におけるその他のPHAポリマーの生体適合性またはインビボ分解を記載するただ1つの報告がある(WO 98/51812)。Witholt, B. およびLageveen, R. G. の米国特許第5,334,698号は、Pseudomonas oleovorans細胞から単離された光学活性ポリエステルで生産された医療用品を記載するが、製造または生体適合性試験についての実施例または議論は記載されず、インビボの医学的使用に適する純粋な形態でポリマーを得るための方法は与えられない。これらのポリマーの作製に適するバクテリアはまた、内毒素および他の炎症媒介物を作成し得るので、このポリマーをこれらの混入物を除去するために処理することが重要である。

【0009】

多くの応用に対して、PHA生分解の速度は、必要とされる製品の寿命に十分適する。しかし、特定の場合では、ポリマーが環境中で分解する速度を超えてより制御を発揮し得ることが望ましい。このような制御は、このクラスのポリマーの応用範囲を広げる。例えば、PHAフィルムは、マルチフィルムとして使用されるために適した機械的特性を有し得るが、この応用に対して最も最適な分解速度を有さない。従って、環境中でポリマーの分解速度を制御し得る能力は、明確な利点である。

【0010】

従って、ポリヒドロキシアルカノエートは、医学的応用に潜在的に役立つ幅広い範囲の機械的特性を提供する一方、特にインビボで再吸収し得るポリマーとしての使用は、そのゆっくりとした加水分解によって制限された。従って、ポリヒドロキシアルカノエートの分解速度を制御する方法を開発することが望まれる。

【0011】

それゆえ、ポリヒドロキシアルカノエートの分解速度を制御する方法を与えることが本発明の目的である。

【0012】

環境中および／またはインビボでより容易に分解するポリヒドロキシアルカノエートを含むまたはこれらから誘導される新規な組成物を与えることが、本発明のさらなる目的である。

【 0 0 1 3 】

これらの組成物から製品およびデバイスを製造するための方法を与えることが、本発明の別の目的である。

【 0 0 1 4 】

(発 明 の 要 旨)

制御された分解速度を有する生体適合性ポリヒドロキシアルカノエート組成物が開発された。1つの実施態様において、ポリヒドロキシアルカノエートは、分解速度を変化させるための添加剤を含む。別の実施態様において、ポリヒドロキシアルカノエートは、その分解速度を変化させるために、モノマーの混合物から形成され、あるいはその骨格にペンダント基または修飾を含む。さらに別の実施態様において、ポリヒドロキシアルカノエートは、化学的に改変される。多孔性または露出される表面積を増加するデバイスを生産する方法は、分解性を変えるために使用され得る。例えば、実施例によって示されるように、多孔性のポリヒドロキシアルカノエートは、細孔、空隙、または間質性の間隔を作成する方法（例えば、乳濁液またはスプレー乾燥技術）またはポリマー内で浸出可能または凍結乾燥可能な粒子を組み入れる方法を使用して作成され得る。実施例は、泡状体、コーティング、メッシュ、および微粒子を含むポリ（４HB）組成物を記載する。実施例に示されるように、これらのポリヒドロキシアルカノエート組成物は、極めて好ましい機械的特性を有し、生体適合性であり、生理学的条件下で所望される時間の枠内で分解する。これらのポリヒドロキシアルカノエート材料は、現在入手可能であるものよりも幅広い範囲のポリヒドロキシアルカノエート分解速度を与える。

【 0 0 1 5 】

これらの材料を処置する方法（特に、治療的、予防的、または診断的応用）、あるいはインプラントされ得るまたは注入され得るデバイス内にこれらの材料を処置する方法がまた、記載される。

【 0 0 1 6 】

(発 明 の 詳 細 な 説 明)

(I . P H A 組 成 物)

(ポリマー組成物)

本明細書で使用される場合は、「PHA材料」は、1つ以上のユニット（例えば、10ユニットと100,000ユニットとの間、好ましくは100ユニットと30,000ユニットとの間）の以下の式Iのユニットを含み：

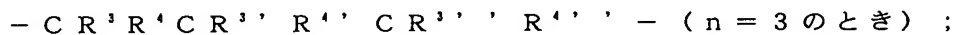
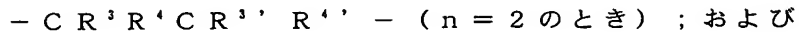
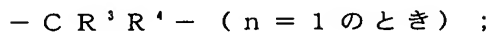


ここで、nは整数（例えば、1と15との間、好ましい実施態様においては、1と4との間）であり；そして

ここで、 R^1 、 R^2 、 R^3 、および R^4 は独立して、炭化水素基（長鎖炭化水素基を含む）；ハローおよびヒドロキシ置換基；ヒドロキシ基；ハロゲン基；窒素置換基；酸素置換基；および／または水素原子であり得る。

【0017】

本明細書中で使用される場合、式 $-(CR^3R^4)_n-$ は、以下の式を含むものとして定義される：



ここで、 R^3 、 R^4 、 $R^{3'}$ 、 $R^{4'}$ 、 $R^{3''}$ 、および $R^{4''}$ は独立して、炭化水素基（長鎖炭化水素基を含む）；ハローおよびヒドロキシ置換基；ヒドロキシ基；ハロゲン基；窒素置換基；酸素置換基；および／または水素原子であり得る。従って、式Iは3-ヒドロキシ酸（ $n=1$ ）、4-ヒドロキシ酸（ $n=2$ ）、および5-ヒドロキシ酸（ $n=3$ ）から誘導されたユニットを含む。

【0018】

これらのユニットは、ホモポリマーにおいて同一であり得、あるいは、例えば、コポリマーまたはターポリマーにおいては、より異なるユニットであり得る。これらのポリマーは典型的には、分子量が300ダルトンを越え（例えば、300ダルトンと10⁷ダルトンとの間）、そして好ましい実施態様においては10,000～10,000,000ダルトンである。

【0019】

PHA材料は、他の分子（例えば、生理活性化合物および検出可能な化合物、

界面活性剤、他の分解性ポリマーまたは非分解性ポリマー)、ならびにPHAの機械的性質を改変するのに使用される材料(例えば、可塑剤、充填剤、核生成剤(nucleating agent)、着色剤、安定剤、調節剤、およびバインダー)を含み得るか、これらを含むために改変され得る。

【0020】

本明細書中に記載されるように改変され得、または処方され得る代表的なPHAは、Steinbuechel, A. およびValentin, H. E., FEMS Microbiol., Lett., 128:219-228 (1995) に記載される。

【0021】

PHBおよびP4HBは、非常に異なる物理的特性を有する。4-ヒドロキシブチレートを含むPHAコポリマーの領域は公知であり得るか、またはPHBの特性とP4HBの特性との中間の特性の領域を用いて調製され得るかのいずれかである(Saito, Y. およびDoi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16:99-104)。しかしながら、P4HBおよびそのコポリマーの生物医学的用途、生体適合性試験およびインビボ分解は報告されていない。4HBおよび3HBのPHAコポリマーは、組成が0~100%4HBに変化するものは、Alcaligenes eutrophus (Nakamura, S., Doi, Y. およびScandola, M. Macromol. (1992) 25:4237-4231) で生産されており、そして64~100%4HBに変化するものは、Comamonas acidovoransにおいて生産されている(Saito, Y. およびDoi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16:99-104)。しかしながら、これらのポリマーは、組換えE. coli中で生産された分子量(5×10^5 g/molより大きい、GPC)と比較して、適切な分子量($1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ g/mol、GPCによる)を有する。

【0022】

PHA生体高分子は、それらのペンダント(pendant)基の長さ、および個々の生合成経路(図1)に従って大きく3つの群に分割され得る。短いペン

ダント基を有するもの（例えば、ポリヒドロキシブチレート（PHB）、R-3-ヒドロキシブチル酸（R-3HB）ユニットのホモポリマー）は、高い結晶性の熱可塑性材料であり、そして最も長い間公知である（Lemoigne, M. および Roukhelman, N., *Annales des fermentations*, 5: 527-536 (1925)）。PHAの第2の群は、かなり長いペンダント基ヒドロキシ酸ユニットとランダムに重合した短いR-3HBユニットを含み、70年代初頭に初めて報告された（Wallen, L. L. および Rohwedder, W. K., *Environ. Sci. Technol.*, 8: 576-579 (1974)）。これら、より長いペンダント基ヒドロキシ酸ユニットを有するR-3HBのコポリマーを特異的に生産する多数の微生物もまた、公知であり、そしてこの第2の群に属する（Steinbuchel, A. および Wiese, S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 691-697 (1992)）。80年代初頭、オランダの研究グループは、PHAの第3の群を確認した。これは圧倒的に長いペンダント基ヒドロキシ酸を含んでいた（De Smet, M. J. ら、*J. Bacteriol.*, 154: 870-878 (1983)）。

【 0 0 2 3 】

PHAポリマーは、細菌の乾燥細胞重量の90%までを構成し得、そして細菌の細胞の内側で顆粒を分散させるものとして発見されている。これらPHA顆粒が栄養制限に応答して蓄積し、そして炭素およびエネルギー貯蔵物質として供する。微生物は明確な経路を使用して、各群のこれらのポリマーを生産する。これらの経路の1つによって、短いペンダント基ポリヒドロキシアルカノエート（SPGPHA）が導かれ、この経路は3つの酵素、すなわちチオラーゼ、リダクターゼ、およびPHBシンターゼ（時折、ポリメラーゼと呼ばれる）を含む。この経路を使用し、2分子のアセチル-補酵素Aの縮合によりアセトアセチル-補酵素Aを得、続いてこの中間体の還元により、R-3-ヒドロキシブチリル-補酵素Aを得、そして続く重合によって、ホモポリマーPHBは合成される（図2A）。この経路における最後の酵素、シンターゼは、C₃~C₅モノマー性ユニット（R-4-ヒドロキシ酸ユニットおよびR-5-ヒドロキシ酸ユニット含む）を

収容し得る基質特異性を有する。この生合成経路は、例えば細菌、*Zoogloe*
ea ramigera および *Alcaligenes eutrophus* 中
で見出される。PHAの第3の群、長いペンダント基ポリヒドロキシアлкаノエ
ート (LPGPHA) を生産するために使用される生合成経路は、まだ部分的に
不明であるが、現在、次のように考えられる。LPGPHAを導くモノマー性ヒ
ドロキシアシルユニットが、脂肪酸の β (b) 酸化および脂肪酸経路によって誘
導される (図2B)。次いで、これらの経路から得られた、R-3-ヒドロキシ
アシル-補酵素基質は、C6~C14の範囲の大きなモノマー性ユニットを好む
基質特異性を有するPHAシンターゼ (時折、ポリメラーゼと呼ばれる) によっ
て重合される。長いペンダント基PHAは、例えば*Pseudomonad*によ
って生産される。

【 0 0 2 4 】

短いR-3HBユニットおよびこれより長いペンダント基モノマーの両方を含
むPHAの第2の群は、恐らく、図2Aおよび図2Bに示される両方の経路を利用
して、ヒドロキシ酸モノマーを提供する。次いで後者が、これらのユニットを
受容することが可能なPHAシンターゼによって重合される。

【 0 0 2 5 】

結局、約100個の異なるタイプのヒドロキシ酸が、醗酵方法によってPHA
中に取り込まれている (Steinbuechel, A. およびValentin
, H. E., FEMS Microbiol., Lett., 128: 219-
228 (1995))。特に、これらは官能基化されたペンダント基 (例えば、
エステル、二重結合、アルコキシ、芳香族、ハロゲンおよびヒドロキシ基) を有
するPHAを含む。

【 0 0 2 6 】

医療用途のための好ましいポリヒドロキシアлкаノエートは、P4HBである
。P4HBは、生体適合性であり、再吸収性であり、加工可能 (process
able) であり、強固かつ延性を有する。破損強度 (breaking st
rength) の維持は、縫合材料、およびステーブル (stapling) 材
料、特に、再吸収性材料のための非常に重要なもう一つのパラメータである。再

吸収性の材料がインビボで分解されるとき、この分解の結果として、これらの物理的および化学的特性は変化する。例えば、再吸収性縫糸は、その破損強度、すなわち組織を固定する能力の大半を、その完全な再吸収にかかる時間よりも速く失う。例えば、PGA縫糸は6週間以前には完全には再吸収されず、インビボ3週間でそれらの強度の大半を失う（V e t S u r g 2 1 ; 1 9 2 : 3 5 5 - 6 1）。この機械的な強度の損失は、ポリマーの分子量の減少の結果である。多くのパラメータがインビボでの再吸収速度および縫糸の破損強度に影響を与える（例えば、組織のタイプ、機械的な応力、感染の存在など）ことに注目することが重要である。

【 0 0 2 7 】

実施例は、インビボでのP4HBの分解速度が、他のPHAと比較して速いが、再吸収速度は多くの再吸収縫糸として使用される材料よりも遅いことを示す。さらに、表7に示されるように、P4HB移植は、再吸収のプロセス中にそれらの分子量を維持する。分子量の維持は、機械的特性すなわち傷の閉鎖材料として使用されるPHAの破損強度の維持に有利であることが期待される。これらの優れた機械的特性、高い分子量の維持、加工能力（p r o c e s s a b i l i t y）、生体適合性能および再吸収性能によって、P4HBおよびP4HB-co-PHAは、特に、本明細書中で改変されてそれらの分解速度を増加させるならば、再吸収可能な傷の閉合材料（例えば、縫合材料およびステーブル材料）として有用である。

【 0 0 2 8 】

（PHAの源）

改変されてPHAの分解速度を変換し得るPHA材料は、生物学的な源、酵素的な源、または化学的な源のいずれかから誘導され得る。生物学的な源は、微生物または高等生物（例えば、植物）であり得、そして遺伝子工学によって誘導され得る。

【 0 0 2 9 】

1980年代中期の間、いくつかの研究グループは、PHAの合成に用い得る遺伝子および遺伝子生成物を発現に同定および単離した。これらの努力が、微生物

物および植物の両方でのPHA生産のための遺伝子組換え系、ならびにPHA合成のための酵素的な方法の発展をもたらした。このような経路はさらに利用可能なPHAの種類を増加させ得た。これらの進歩は、以下に総説されている：Williams, S. F. およびPeoples, O. P., CHEMTECH, 26, 38-44 (1996)、ならびに、Williams, S. F. およびPeoples, O. P.; Chem, Br. 33, 29-32 (1997)。

【0030】

後に改変して、それらの分解速度を変えることに適している、PHAポリマーを生成するために使用される得る方法は、以下に記載されている：米国特許第4,910,145号(Holmes, P. A. およびLim, G. B.) ; D. Byrom編、「Biomaterials」MacMillan Publishers, London, 1991、頁333-359中における、Byrom, D. 「Miscellaneous Biomaterials」; G. J. L. Griffin編、「Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers」Chapman and Hall, London, 1994、頁48-96中における、Hocking, P. J. およびMarchessault, R. H. 「Biopolyesters」; D. C. Bassett編「Developments in Crystalline Polymers」Elsevier, London, Vol. 2, 1988、頁1-65中におけるHolmes, P. A. 「Biologically Produced (R)-3-hydroxyalkanoate Polymers and Copolymers」; H. J. RehmおよびG. Reed編「Biotechnology」Verlagsgesellschaft, Weinheim, Vol. 66, 1988、頁135-176中におけるLaffertyら、「Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric acid」; MullerおよびSeebach, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32: 477-502 (1993) ; D. Byrom編、「Biomaterials」, MacMillan Publishers, Lo

ndon, 1991、頁123-213中における、Steinbuechel, A. 「Polyhydroxyalkanoic Acids」; ならびに、Williams および Peoples, CHEMTECH, 26:38-44 (1996); Steinbuechel および Wiese, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37:691-697 (1992); 米国特許第5, 245, 023号; 同第5, 250, 430号; 同第5, 480, 794号; 同第5, 512, 669号; 同第5, 534, 432号; Agostini, D. E. ら、Polym. Sci., Part A-1, 9:2775-2787 (1971); Gross, R. A. ら、Macromolecules, 21:2657-2668 (1988); Dubois, P. I. ら、Macromolecules, 26:4407-4412 (1993); Le Borgne, A. および Spassky, N., Polymer, 30:2312-2319 (1989); Tanahashi, N. および Doi, Y., Macromolecules, 24:5732-5733 (1991); Hori, Y. M. ら、Macromolecules, 26:4388-4390 (1993); Kemnitzer, J. E. ら、Macromolecules, 26:1221-1229 (1993); Hori, Y. M. ら、Macromolecules, 26:5533-5534 (1993); Hocking, P. J. および Marchessault, R. H., Polym. Bull., 30:163-170 (1993); Xie, W. ら、Macromolecules, 30:6997-6998 (1997)、および、米国特許第5, 563, 239号 (Hubbs, J. C. および Harrison, M. N.)。これらの方法で誘導される PHA は、任意の形態 (ラテックスまたは固体形態を含む形態) であり得る。

【 0 0 3 1 】

組換え生物のうち幾つかの微生物から、PHA の生合成に関する遺伝子の同定、クローニング、および発現によって、自生の PHA 生産者でない生物での PHA の生産が可能となる。このような組換え生物は研究者に PHA 生成プロセスのより高度な制御を供する。なぜなら、それらは、所望しない PHA 前駆体の生合

成またはPHA分解に関する酵素活性のバックグラウンドがないからである。さらに、組換え生物の適切な選択によって、生産されたPHAの精製を促進し得るか、または生産されたPHAの生体適合性の増加が可能となり得る。

【 0 0 3 2 】

組換え生物におけるPHAの合成に対する最低限の要件は、ヒドロキシアルカノイル-CoAの源および適切なPHAシンターゼの源である (Gerngross, T. U. および Martin, D. P. Proc. Natl. Acad. Sci. (1995) 92: 6279-6283.)。従って、組換えPHA生産者は、ヒドロキシアルカノイル-CoAモノマーの生合成経路および適切なPHAシンターゼを必要とする。多様性基質の生産によってPHAコポリマーの形成が起こるので、ホモポリマーの生産には、この生物がPHAシンターゼに対する1つの適切な基質のみを生産することが必要である。PHAシンターゼをコードする導入遺伝子を含む組換え生物は、PHBの生産に十分である。

【 0 0 3 3 】

PHA分解経路がない場合、組換え生物において蓄積されたPHAの分子量は、非常に高くなり得る。組換えE. coli中で生産されたPHBが、 4×10^6 g/molの分子量を有することが報告されている (Sim, S. J., Snell, K. D., Hogan, S. A., Stubbe, J., Rha, C. および Sinskey, A. Nature Biotech. (1997) 15: 63-67)。この分子量は所定のPHAの物理的特性を制御するため重要である。なぜなら、組換え生物中で生産されたPHAの増加した分子量によって、改善された物質の特性 (例えば、増加した引っ張り強さ、および極限のび) がもたらされ得るためである (Kusaka, S., Iwata, T. および Doi, Y., J. M. S. Pure Appl. Chem. (1998) A35: 319-335)。

【 0 0 3 4 】

低レベルのPHB (1.5%)を含むP3HB-co-P4HBの生合成が、組換えE. coliで説明されている (Valentin, H. E., Dennis, D. J. Biotech. 1997, 58: 33-38)。これらPHAの

分子量が非常に大きかった ($1 \times 10^6 \text{ g/mol}$ より大きい) ことに注目すべきである。さらに、組換え *E. coli* における P3HB-co-4HB およびホモポリマー P4HB の生合成が説明されている (Heinら、*FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 153; 411-418)。

【 0 0 3 5 】

PHA 合成の生物学的経路の使用の他に、 PHA ポリマーはまた、化学合成により誘導され得る。広く用いられる1つのアプローチは、様々な触媒または開始剤 (例えばアルミノオキサン、ジスタノオキサン、またはアルコキシ-亜鉛およびアルコキシ-アルミニウム化合物) を使用する、 β -ラクトンモノマーの開環重合を含む (Agostini, D. E. ら、*Polym. Sci., Part A-1*, 9: 2775-2787 (1971); Gross, R. A. ら、*Macromolecules*, 21: 2657-2668 (1988); Dubois, P. I. ら、*Macromolecules*, 26: 4407-4412 (1993); Le Borgne, A. および Spassky, N., *Polymer*, 30: 2312-2319 (1989); Tanahashi, N. および Doi, Y., *Macromolecules*, 24: 5732-5733 (1991); Hori, Y. M. ら、*Macromolecules*, 26: 4388-4390 (1993); Kemnitzer, J. E. ら、*Macromolecules*, 26: 1221-1229 (1993); Hori, Y. M. ら、*Macromolecules*, 26: 5533-5534 (1993); Hocking, P. J. および Marchessault, R. H., *Polym. Bull.*, 30: 163-170 (1993) を参照のこと)。第2のアプローチは、エステル縮合重合を含み、そして米国特許第5, 563, 239号 (Hubbs, J. C. および Harrison, M. N.) ならびにその明細書中の参考文献で説明されている。研究者はまた、化学酵素的 (*chemo-enzymatic*) 方法を開発し、 PHA を調製している。例えば、Xieら、*Macromolecules*, 30: 6997-6998 (1997) は、好熱性リパーゼによる β -ブチロラク톤の開環重合を報告しており、 PHB を得ている。

【 0 0 3 6 】

P 4 H B または P 4 H B - c o - H A の生物学的な生成は、従来の化学的合成方法に優る、ある程度の利点を有する。高い分子量の P 4 H B (1×10^5 g / m o l より大きい) の化学合成は困難である。それは、ラクトン化して、比較的に歪みのかからない、かつ速度論的に好ましい 5 員環を形成する、遊離酸の傾向のためである。従って、4-ヒドロキシブチル酸の重縮合を達成することは困難である。同時に、 γ -ブチロラク톤の高圧の開環重合反応から生じるこの物質が非常に低い分子量を有し (K o r t e , F . および G e l t , W . , P o l y m e r L e t t . 1 9 9 6 , 4 , 6 8 5) 、かつ低い機械的特性を有する。P 4 H B の代替合成戦略、2-メチレンジオキソランのフリーラジカル開環重合によって、開環および閉環ユニットが混入するコポリマーが生じる (B a i l e y , ら、J . P o l y m . S c i . P o l y m . C h e m . (1 9 8 2) 2 0 : 3 0 2 1 - 3 0 ; B a i l e y , W . J . P o l y m . P r e p r i n t s (1 9 8 4) 2 5 : 2 1 0 - 1 1 .) 。4 H B はうまく、開環重合を経由して 3 H B と共重合される (H o r i , Y . , Y a m a g u c h i , A . および H a g i w a r a , T . P o l y m e r 1 9 9 6 , 3 6 , 4 7 0 3 - 4 7 0 5) 、しかしながら、特に、4 H B が 8 0 % より多い組成物 (2×10^4 g / m o l 未満) に関して、このコポリマーの分子量は適切であった (1×10^5 g / m o l 未満) 。さらに、ポリエステルはこの化学的合成に使用された多くの触媒は、毒性金属を含む。これらの毒性混入物は、生物学的なプロセスを使用して P H A を生成することで回避され得る。

【 0 0 3 7 】

(I I . 変更された分解速度を有する P H A 処方物)

ポリマーの分解速度は、様々な成分のポリマーの組成物への添加、ならびに化学組成、分子量、加工条件および最終ポリマーの生成物の形態の選択を通して変化され得る。この化学組成は、ポリマー中に取り込まれるモノマーの選択を通して、結合、化学骨格またはペンダント基の変更によって、および／または分子量の調節によって変更され得る。多孔度、親水性物質の包含物の増加、および／または水に曝露される表面積の増加により、分解速度が結局、増加する。疎水性コ

ーティング、またはこのポリマーの疎水性物質への取り込み、またはこのポリマーの疎水性物質との混合により分解の速度が減少せられる。

【 0 0 3 8 】

(分解速度を変更させる添加剤)

ポリヒドロキシアルカノエートの加水分解は、酸性の pH および塩基性の pH において加速される。従って、酸性または塩基性の添加剤もしくは賦形剤の包含物が、PHA の分解速度を変えるために使用され得る。このような包含物は、顆粒として添加され得、任意の他の添加剤、もしくは、取り込まれた、または取り込まれるべき試剤と混合され得るか、あるいはポリマー内に溶解され得る。

【 0 0 3 9 】

分解速度を促進させる添加剤には、無機酸（例えば、硫酸アンモニウム、および塩化アンモニウム）、有機酸（例えば、クエン酸、安息香酸、ペプチド、アスコルビン酸）、無機塩基（例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛、および水酸化亜鉛）、および有機塩基（例えば、硫酸プロタミン、スペルミン、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、およびトリエタノールアミン）および界面活性剤（例えば、TweenTM および PluronicTM）が挙げられる。このような添加剤は、好ましくは、0.1 重量%と30 重量%との間の濃度で使用される。

【 0 0 4 0 】

また、細孔を形成するか、さもなくばポリマー中の表面積を増大させ、もしくはポリマーのアモルファス含有量を増加させる添加剤によって、分解速度は促進され得る。増孔剤 (pore forming agent) は一般に、微粒子として添加され、そして浸出によって除去される水溶性の化合物（例えば、無機塩、および糖）を含む。適切な粒子には、塩結晶、タンパク質（例えば、ゼラチン、アガロース）スターチ、多糖類（例えば、アルギネート）および他のポリマーが挙げられる。これらの粒子の直径は好適に、ナノメートルと500 ミクロンとの間であり得る。それらはまた、凍結乾燥可能であり得る。増孔剤0.01%と90%（容量に対する重量）との間の量、好ましくは、1%と30%（w/w、ポリマー）との間のレベルで含まれ得、細孔の形成を増加させる。例えば、スプ

レー乾燥または溶媒の蒸発において、増孔剤（例えば、揮発性の塩（例えば、炭酸水素アンモニウム、酢酸アンモニウム、塩化アンモニウム、または安息香酸アンモニウム）または他の凍結乾燥可能な塩）をまず、水に溶解させる。次いで、増孔剤を含む溶液を、ポリマー溶液で乳化して、ポリマー中に増孔剤の液滴を形成させる。次いで、このエマルジョンをスプレー乾燥または溶媒蒸発／抽出プロセスに通す。ポリマーを沈殿させた後、この硬化微少粒子を、凍結および凍結乾燥して、増孔剤を除去する。可塑剤（例えば、クエン酸エステル、およびアタクチックポリヒドロキシアルカノエートのような他のポリマー）を添加し、ポリマーのアモルファス特性を増加させ得る。

【 0 0 4 1 】

分解速度を増加させるために取り込まれ得る疎水性コーティングまたは疎水性物質は、疎水性化合物（例えば、リン脂質、コレステロール、および他のポリマー）、ならびに界面活性剤を含む。これらの材料および、この材料中へのコーティングまたは組み込みを形成するための方法は、以下で説明されている：WO 96 / 1 8 4 2 0（Bracco Research SAによる）、WO 92 / 1 8 1 6 4（Delta Biotechnology, Ltd. による）、WO 95 / 0 3 3 5 6（Massachusetts Institute of Technologyによる）、PCT / US 97 / 0 3 0 0 7（Acusphereによる）、米国特許第5, 2 7 1, 9 6 1号（Mathiowitzら）、米国特許第5, 7 1 1, 9 3 3号（Bichonら）、ならびに米国特許第5, 7 0 5, 1 8 7号（Unger）。特定の実施例は、エマルジョン／カプセル化（encapsulation）プロセスの間、水相中の油相を安定化させるための乳化剤としての脂肪酸およびリン脂質を開示し、これらの微粒子は界面活性剤の外層により被膜されるという結果を伴う。また、ポリマー壁（polymer wall）を疎水化（hydrophobize）するため、および水の浸透を遅らせるための、添加剤（例えば、脂質、ワックスおよび高分子量の炭化水素）の使用を、開示する。

【 0 0 4 2 】

（PHAペンダント基の改変）

P H A ポリマーの分解速度を変化させるさらなる方法は、ポリヒドロキシアルカノエートペンダント基の改変を含有する。このペンダント基は、全体または部分で改変され得る。例えば、ペンダント基は、カルボン酸およびアミンのような酸性基および塩基性基に変換され得る。これらのタイプの基は、局所的なp H 値を変化させることで、分解を増進させ得る。あるいは、このペンダント基は、アルコールおよびアミンなどの反応基に変換され得、分子内または分子間の反応のどちらかでポリマーの骨格を切断し得る。これらの変換に加えて、このペンダント基はまた、水のような加水分解性の試薬の取込みを増加させるために親水基に変換し得、またはこれらはポリマーの非結晶性を増加させる基に変換し得る。このペンダント基の官能基の変換を実施するために必要な手順は、当業者にとって周知である。本発明のP H A を調製するために使用され得る1つの適切な方法は（ポリマーの分解速度を変える単位を取り込む）は、H e i n 、S o h l l i n g 、G o t t s c h a l k 、およびS t e i n b u c h e l らによるW O 9 8 / 3 9 4 5 3 に開示される。分解速度を変化させるP H A ポリマーの中で適切なペンダント基はまた、発酵によって直接誘導され得る。

【 0 0 4 3 】

（P H A の化学修飾）

ポリヒドロキシアルカノエートの加水分解の速度は、多数の因子に依存する。1つの鍵となる因子は、モノマー間のエステル結合の化学的な性質または反応性である。次いで、P H A 骨格の分解速度は、加水分解または酵素の攻撃に対して、より敏感な化学結合をポリマー骨格の中に取り込むことによって変化し得る。ポリマーの分解速度を変えるために、ポリヒドロキシアルカノエート骨格に取込まれ得るモノマーの例は、グリコール酸および乳酸のような2-ヒドロキシ酸、ならびに2-ヒドロキシエトキシ酢酸のようなエステル結合の反応性を変調するような他のヒドロキシ酸がある。加水分解またはヒドロキシ酸の攻撃に、より敏感なエステルを得る他のヒドロキシ酸の取込みに加えて、他のタイプの官能基がポリマー骨格に取込まれ得る。例えば、1以上のエステル結合が、アミド、無水物、カルボネートまたはカルバメートのような基によって置換され得る。ポリヒドロキシアルカノエート骨格に取込まれ得るモノマーの例は、アミノ酸およびア

ミノアルコールである。さらに、多官能基モノマーは、ポリヒドロキシアルカノエート骨格に取込まれ得る（例えば、トリオールまたはテトラオール）。これらのタイプのモノマー単位はまた、架橋剤の交換によってポリマーの分子量を増加させ、または保持し、あるいは、ポリマーの結晶性を改変するために使用され得る。

【 0 0 4 4 】

さまざまな方法が、敏感な化学結合を、ポリヒドロキシアルカノエート骨格に取込むために使用され得る。例えば、コフィード (c o - f e e d) が、P H A の発酵の間に加えられ得、その結果所望のモノマーが取込まれる。適切なコフィードは、ヒドロキシアルコキシ酢酸を含有する。これらのタイプのモノマーはまた、触媒を使用して、および P H A 合成酵素のような酵素触媒を使用する補酵素 A 誘導体を介して、ヒドロキシ酸モノマーからの化学合成の間に取り込まれ得る。

【 0 0 4 5 】

敏感な化学結合はまた、初期合成の後、ポリヒドロキシアルカノエート骨格に取り込まれ得る。これを達成する方法は、挿入反応、放射線、エステル化、エステル交換（例えば、O t e r a , J . ら T e t r a h e d r o n L e t t . , 2 7 : 2 3 8 3 ~ 2 3 8 6 (1 9 8 6) 、 O t e r a , J . ら、J . O r g . C h e m . , 5 6 : 5 3 0 7 ~ 5 3 1 1 (1 9 9 1) 、 O t e r a , J . ら、J . O r g . C h e m . , 5 4 : 4 0 1 3 ~ 4 0 1 4 (1 9 8 9) および O t e r a , J . ら、J . C h e m . S o c . , C h e m . C o m m u n . , 1 7 4 2 ~ 1 7 4 3 (1 9 9 1) を参照のこと）、エステル転移反応（例えば、S t a n t o n , M . G . および G a g n e , M . R . , J . A m . C h e m . S o c . , 1 1 9 : 5 0 7 5 ~ 5 0 7 6 (1 9 9 7) ならびに本明細書の文献を参照のこと）、および反応性ブレンディング (r e a c t i v e b l e n d i n g) などの化学形質転換を含む。後者の場合において、化学反応は、触媒存在下での融解した状態にて実施され得る。例えば、エステルまたはポリエステルは、ポリヒドロキシアルカノエートを化学的に改変するために適切な触媒の存在下で、ポリヒドロキシアルカノエートとともに融解させ得る。

【 0 0 4 6 】

(敏感な結合を含有する P H A の処理)

ポリヒドロキシアルカノエートは、さらに幅広い範囲のポリマー処理技術を使用して操作され得る。これらの材料を処理するための好ましい方法は、以下を含有する：溶媒キャストリング、融解処理、ファイバー処理／紡績／織り込み、押出し、射出および圧縮成形、ならびに積層化。

【 0 0 4 7 】

(I I I . 医療デバイスの製造のための方法)

このポリマー組成物は、様々な生分解性医療デバイスを調製するために有用である。好ましくは、この生分解性ポリマーは、比較的遅い生分解性を示し、例えば、インビボで 3 ヶ月～6 ヶ月、またはそれ以下の半減期を有する。好ましくは、このポリマーは、比較的低い融解点／ガラス転移温度を有し（例えば 136℃未満）および／または無毒性、非ハロゲン化溶媒に、簡単な処理で溶解する。

【 0 0 4 8 】

非熱分解性 (d e p y r o g e n a t e d) の P H A が体内に移植される場合、これらの材料は、もしあるにしても、急性の炎症反応または、任意の有害な組織反応をほとんど示さない。これらは、重要な炎症応答または傷跡組織形成が全くない。炎症細胞の補充は、最小である。外移植されたデバイスの組織学的な実験によると、この材料は基本的に不活性であることが実証された。さらに P H A で構成されたデバイスは、周りの組織に最小の有害な影響で移植され得る。移植された材料からのヒドロキシ酸分解生成物の放出は、典型的に遅く、そして体により耐溶性を示す。従って、P H A は、おおよそ 1 ヶ月間材料特性を保持し、そして最終的に無毒性材料に分解することが期待される。

【 0 0 4 9 】

P H A から調製されるデバイスは、幅広い範囲の異なる医療用途のために使用され得る。このような用途の例としては、制御された放出、薬物送達、組織工学骨格、細胞のカプセル化；ターゲット送達、生体適合性コーティング；生体適合性移植片；誘導組織再生、傷口の包帯、整形デバイス、補綴ならびに骨の接合剤（接着剤および／または構造賦形剤を含有する）、および診断が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

P H A は、任意の様々な治療的、予防的または診断上の試薬と混合され得るか、もしくは、それらにイオン結合的にまたは共有結合的に結合されてカプセル化し得る。幅広い様々な生分解性活性材料が、ポリヒドロキシアルカノエートによる部位への送達のため、またはポリマーへの特性を賦与する（例えば、バイオ接着、細胞付着、細胞成長の増強、細菌の成長の阻害および血塊形成の防止など）ためのどちらかで、カプセル化または取込まれ得る。

【 0 0 5 1 】

適切な医療的および予防的な試薬の例として、医療的、予防的または診断上の活性を有する合成無機化合物および有機化合物、タンパク質およびペプチド、ポリサッカリドおよび他の糖や脂質、ならびに D N A および R N A 核酸配列が挙げられる。核酸配列として、遺伝子、転写を阻害するために相補的に D N A に結合するアンチセンス分子、およびリボザイムが挙げられる。幅広い範囲の分子量を有する化合物は、例えば、1 モル当り 1 0 0 ~ 5 0 0 , 0 0 0 グラムでカプセル化され得る。適切な材料の例は、抗体、受容体リガンドおよび酵素のようなタンパク質、接着ペプチドのようなペプチド、サッカリドおよびポリサッカリド、合成有機薬剤または無機薬剤、ならびに核酸を含有する。カプセル化され得る材料の例は、酵素、血液凝固因子、阻害剤またはストレプトキナーゼのような血栓溶解剤、および組織プラスミノゲン活性化因子；免疫に対する抗原；ホルモンおよび成長因子；ヘパリンのようなポリサッカリド；アンチセンスオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチド、リボザイムおよび遺伝子治療に使用するためのレトロウイルスのベクターを含有する。このポリマーはまた、細胞および組織をカプセル化し得る。代表的な診断剤は、X線、蛍光、磁気共鳴画像法、放射活性、超音波、コンピュータ断層診断（C T）および陽電子放出断層撮影法（P E T）によって検出可能な試薬である。超音波診断剤は、典型的に空気、酸素またはパーフルオロカーボンのようなガスである。

【 0 0 5 2 】

制御された放出の場合において、幅広い範囲の異なった生理活性化合物は、制御された放出デバイスに取込まれ得る。これらは疎水性、親水性および高い分子量の高分子（例えば、タンパク質）を含む。この生理活性化合物は、0 . 1 重量

%と70重量%、より好ましくは5重量%と50重量%の間の充填割合で、PHA内に取込まれ得る。このPHAは、粉末、フィルム、成形品、粒子、球体、ラテックスおよび結晶または非結晶の材料のような、ほぼ任意の物理形状となり得る。これらは、例えば、他のポリマーのような追加の非PHA材料と結合し得る。これらは、遅い分解性の、生体適合性の、成形可能な材料（例えば医療デバイス）を必要とする用途での使用に適している。ポリマーから調製し得る医療デバイスの例としては、ロッド、骨のねじ釘、ピン、外科手術の縫合、ステント、組織工学のデバイス、薬剤送達デバイス、傷口の包帯、ならびにヘルニアのパッチおよび心膜のパッチのようなパッチが挙げられる。

【 0 0 5 3 】

PHAで作製される分解可能な移植片は、幅広い範囲の整形および血管性の用途、組織工学、誘導組織再生、ならびに他の熱可塑性のエラストマーによって現在役立っている用途に使用され得る (McMillin, Rubber Chem. Technol., 67: 417~46 (1994))。この移植は、修復および治癒を刺激する他の要素を含有し得る。好ましいデバイスは、体液の通過に適切なチューブである。これらのデバイスは、細胞接着因子、成長因子、ペプチドならびに抗体およびそれらの断片で修飾され得る。

【 0 0 5 4 】

製造された医療デバイスの好ましい方法としては、溶媒キャストリング、融解処理、押出、注射および圧縮成形、ならびにスプレー乾燥が挙げられる。部品は、好ましくは、発酵に基づくプロセス、または溶媒エバポレーートの技術、二重の乳濁液技術、または当該分野で利用可能な方法を使用したマイクロ流動化によって直接調製される (Koosha, F. Ph. D. Dissertation, 1989, Univ. Nottingham, UK., Diss. Abstr. Int. B51: 1206 (1990); Bruhn, B. W. および Mueller, B. W. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18: 668~69 (1991); Conti, B. ら, J. Macroencapsulation, 9: 153~166 (1992); Ogawa, Y. ら, Chem. Pharm. Bull., 36

: 1095~103 (1988) ; Mathiowitz, E. および Langer, R. 「Polyanhydride microspheres as drug delivery systems」、M. Donbrow 編、「Microcapsules Nanopart. Med. Pharm.」CRC, Boca Raton, Florida, 1992 年、5 章、99~123 頁) 。

【 0 0 5 5 】

この PHA は、創傷治癒に適切なデバイスの中に組み込まれ得る。例えば、この目的のための織り込まれていない繊維状の材料は、第一にポリマー繊維を生成し、穿孔処理した放出口からポリマーに圧力をかけ、当業者に公知の手順を使用して調製され得る。この繊維は、次いでこれらを固体支持体上に展開し、そして圧縮成形をかけることで多孔性の膜（織物）に組み込まれ得る。このデバイスの厚さは、好ましくは $500\mu\text{m}$ 未満である。この創傷治癒デバイスはまた、多孔性を得るためにレーザーを使用するか、または多孔性の材料を調製するために浸出技術を使用して、フィルムまたは膜を穿孔処理することで調製し得る。この細孔の寸法は、理想的には細胞および他の組織物質を閉塞するのに十分に小さくあるべきである。この創傷治癒デバイスは、インビボで組織を分離しそして組織再生を刺激するために配置され得る。

【 0 0 5 6 】

この PHA は、細胞をカプセル化するために使用され得る。当業者に公知の手順を使用することで、最初に細胞を事前コートされ得る。Maysinger, Reviews in the Neuroscience, 6 ; 15~33 (1995) を参照のこと。次いで、二重エマルジョンの技術のような粒子カプセル化の手順を使用して、この細胞は PHA によってカプセル化され得る。Ogawara, Chem. Pharm. Bull., 36 : 1095~103 (1988) を参照のこと。カプセル化した細胞は、次いで、インビボで移植され得る。

【 0 0 5 7 】

この PHA は、幅広い範囲のポリマーの処理技術を使用して組織工学骨格に取り込まれ得る。PHA 組織工学骨格を取込む好ましい方法としては、溶媒キャス

ティング、融解処理、ファイバー処理／紡績／織り込み、抽出、注射および圧縮成形、ならびに積層化、そして溶媒浸出／溶媒キャストリングを含有する。このような方法は、当業者に公知である。

【 0 0 5 8 】

P H A 組織工学骨格を組み込む一つの好ましい方法は、B r a b e n d e r 押出し機のような、押出し機の使用を含有する。例えば、この技術は、ある範囲の長さおよび寸法、移植に適切な押出されたチューブを調製するために使用され得る。

【 0 0 5 9 】

別の好ましい方法は、繊維から不織の P H A 骨格の処理を含有する。繊維は、融解または溶媒から調製され得、そして当業者に公知の方法を使用して不織布に処理され得る。不織布の特性は、例えば、P H A 材料、繊維の寸法、繊維の密度、材料の厚さ、繊維の配向、および繊維の処理の方法を変化させることで変更され得る。この多孔性の膜は、所望すれば、さらに処理され得る。例えば、これらの膜は、中空のチューブに形成され得る。

【 0 0 6 0 】

別の好ましい方法は、適切な P H A を適切な型わく内に処理し、そして所望の多孔性を達成するためにレーザーまたは、他の方法を使用して材料を穿孔する融解または溶媒を含有する。圧縮成型した P H A シートをループに巻く工程および熱シールする工程を包含する方法もまた好ましい。この P H A シートは、必要に応じて、第二生分解ポリマーのような他の物質と共に巻かれ得る。例えば、後者の物質は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、またはグリコール酸および乳酸の共重合体の不織布であり得る。このような手順によって、新しい容器、ダクトおよびチューブの工業技術での使用に適した積層チューブが提供されるべきである。この P H A はまた、他の組織工学骨格をコートするのに使用され得る。このような材料は、他の分解性ポリマーから誘導され得る。コーティングはまた、例えば、溶液を基礎とした溶媒で、または融解技術によって、または P H A ラテックスを使用して実施され得る。

【 0 0 6 1 】

この組織工業デバイスは、本明細書中において、移植の前または移植の後に細胞でシードされ得る。この細胞は、ドナーの組織の健康な部分から取り出され、インピボで細胞培養技術を使用して展開し、次いで移植の前または後のどちらかで骨格（または基質）にシードされ得る。あるいは、この細胞は、他のドナーの組織からまたは現存の細胞株から獲得され得る。

【 0 0 6 2 】

このPHAはまた、他のデバイスおよび材料をコートするために使用される。このようなコーティングは、医療の用途のために特性を改良し得、例えば、生態適合性、機械的な特性を改良し、ならびに分解および制御された放出の性質を合わせる。このPHAはまた、上に記載される取り込みの手順を使用して、他のデバイスの上にコートされ得る。このコーティングの厚さは、コーティングの重量または適用する濃度を変えること、または／および保護膜によって特定の用途の要求に対して調整され得る。

【 0 0 6 3 】

このPHAは、幅広いポリマー処理技術を使用してステントの中に取込まれ得る。PHAステントを取込む好ましい方法は、溶媒キャストリング、融解処理、ファイバー処理／紡績／織り込み、押出、射出および圧縮成形を含む。このような方法は、当業者に公知である。

【 0 0 6 4 】

移植の前に、生体再吸収可能な重合体物質は、受容者の疾患および感染を防ぐため滅菌しなければならない。滅菌は、ポリマーデバイスを細胞にシードする前に実施される。物質を含むPHAの熱滅菌はしばしば、特にPHAが熱滅菌処理に必要とされる温度よりも低い融解温度を有する場合、熱処理によって物質を変形し得るので実施不可能である。この問題は、滅菌剤として冷エチレンオキシドガスを使用することで克服され得る。移植前に物質を含有するPHAをエチレンオキシドの蒸気に暴露することによってこの物質を滅菌し、移植にとって適したものにする。冷エチレンオキシドガスを用いた滅菌の間、物質を含むPHAは、その形状を保った。このタイプの処理は、理想的には成型された、または形成された物質の滅菌に適しており、ここで、この物質の形状が適切な機能において重

要な役割を果たす。

【 0 0 6 5 】

この本明細書中に記載されるデバイスは、全身的または局部的に投与され得、またはさらにインビボで、特に細胞培養に使用され得る。このデバイスを全身に投与する好ましい方法は、注射、吸入、経口投与および移植によるものである。デバイスを投与する他の適切な方法は、局所的に、ローション、軟膏、パッチ、または包帯としてデバイスを投与する工程を包含する。

【 0 0 6 6 】

本明細書中に記載される組成物および方法は、さらに以下の非限定的な実施例を参考として理解される。

【 0 0 6 7 】

(実施例 1 : 組換え *Escherichia coli* での P 4 H B 1 の生成)

E. coli 株 MBX 1 1 7 7 (唯一の炭素源として 4 - ヒドロキシ酪酸 (4 H B) を成長させる能力から選択された株 DH 5 α の誘導体) は、*Ralstonia eutropha* からの PHA 合成酵素、*Clostridium kluyveri* からの 4 - ヒドロキシブチリル - CoA 転移酵素、およびアンピシリンへの耐性を与える β - ラクタマーゼ、をコードする遺伝子を含むプラスミドである p F S 3 0 で形質転換した。この合成酵素および転移酵素は、p F S 3 0 の中で、イソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) によって導入される *trc* プロモータの制御下にある。これらの細胞は、最初に 2 5 0 m l のエルンマイヤーフラスコ中で 1 0 0 m l の L B (*Luria Broth*、*Difco*、*Detroit*、*Mich.* ; 2 5 g / L) および 1 0 0 μ g / m l のアンピシリン中で一晩、3 7 $^{\circ}$ C、2 0 0 r p m で振盪させることで成長させた。この全培養物を、7 L の容器で実施される発酵のための種菌として使用した。この発酵の第一ステージは、3 7 $^{\circ}$ C において 8 0 0 r p m での攪拌、および 1 分間当りの体積測定の 1 容量 (v v m) で通気しながら、5 L の L B - アンピシリン中で成長するバイオマスからなる。1 7 時間後、この容量は、1 リットルの媒体を加えることによって 6 L に調整し、全容量が 1 リットル当たり以下を

含むようにした：2.5 g の L B 粉末、ナトリウム塩としての 5 g の 4 H B、2 g の グルコース、50 mmol の リン酸カリウム (pH 7)、7 g の リン酸、100 μ g の アンピシリン、および 0.1 mmol の I P T G。この時点で、温度は 33 $^{\circ}$ C に調整され、そしてこの攪拌速度は、400 rpm に減少させた。グルコースおよびナトリウム 4 H B の周期的添加は、pH が顕著にそれぞれ 7 未満または 7 より上である場合になされた。なぜならグルコースの添加はこの pH を徐々に減少させ、および 4 H B の添加はこの pH を徐々に増加させるからである。この pH は、自動的に制御されなかった。この発酵は、さらに 70 時間の間この方法で進行し、その時間に、全部で 34 g/L のグルコースおよび 15 g/L の 4 H B が供給された。この細胞は 4 $^{\circ}$ C にて 2 日間静置させ、この時間の後、液体相は取り除かれ、そして細胞の懸濁液は、Microfluidics Corporation (Newton, Mass.) M1.10-EH Microfluidizer 内で 18,000 psi で流動化された。得られた物質は、凍結乾燥され、加熱 (60 $^{\circ}$ C) そして機械的に攪拌されながらテトラヒドロフラン (THF、3% wt/vol の P 4 H B) の中に抽出された。この得られた THF 抽出物は、ガラスマイクロ繊維 (2.3 μ m) および Teflon (2 μ m) デプスフィルターを通して圧力濾過した。このポリマーは、等しい容量の水の中で沈殿させ、そして凍結乾燥した。このポリマーは、THF (3% wt/vol の P 4 H B) 中で加熱 (60 $^{\circ}$ C) しながら再溶解させ、そしてこの溶液をガラスマイクロ繊維 (2.3 μ m) および Teflon (2 μ m) デプスフィルターを通して濾過し、水/THF (1:1) 中で沈殿させた。この沈殿物を水/THF (1:1) で洗浄し、そして凍結乾燥し、白色の発泡体 (20 g) を得た。この材料は、ポリ-4-ヒドロキシブチレートであると同定し、寒天拡散アッセイ (ISO 10993、Toxicon Corp., Bedford, MA) によって非細胞毒性であることを示した。元素分析によると、C 55.63%、H 7.41%、O 37.28%、N 41 ppm であった。GC 分析は、精製したポリマー中の非常に低い脂質の存在を示す。NMR 分析では、予想のピークを示し、脂質は存在しない。

(実施例 2 : 組換え *E s c h e r i c h i a c o l i* . におけるポリ (4 H B - c o - 2 H B) の生成)

E. coli 株 MBX1177 / pFS30 および MBX184 (CGSC6966) / pFS30 を、1 リットルのエルレンマイヤーフラスコ中の 300 mL の LB - アンピシリン中で、30℃で一晩、200 rpm で振盪しながら前培養した。各々の前培養の 2 つの 100 mL のアリコートを送心分離 (2000 × g 、10 分間) し、これらのアリコートの各々から得られた細胞を、1 リットル当り ; 6 . 25 g LB 粉末 ; 2 g グルコース ; 50 mmol リン酸カリウム (pH 7) ; 100 μg アンピシリン ; および 100 μmol IPTG を含有する 100 mL の培地に再懸濁した。この培地はまた、2 - ヒドロキシブチレート (2 HB) および 4 HB を含み ; 片方のフラスコでは、その濃度は 8 g / L 2 HB 、および 2 g / L 4 HB であり、そして他方では、2 つの酸の濃度は各 5 g / L であった。両方の酸を、ナトリウム塩としてフラスコに添加した (酸についての所定の質量は、ナトリウムの質量を含まない) 。これら 4 つのフラスコ (各株について 2 つのフラスコ) を、30℃でさらに 48 時間、200 rpm で振盪しながらインキュベートした。これらの細胞を送心分離 (2000 × g 、10 分) により培地から取り出し、水で 1 回洗浄し、再び送心分離し、そして凍結乾燥した。ガスクロマトグラフィー分析をこの凍結乾燥した細胞塊について実施し、ポリマー含量および組成について分析した (表 2 を参照のこと) 。この細胞の生産 PHA の含量および組成を表 2 に示した。2 HB の 4 HB に対する比が 4 : 1 の場合、このポリマーの 2 HB 含量は、GC 分析により両株とも 19 % より高く、一方、2 HB の 4 HB に対する比が 1 : 1 では、このポリマーの 2 HB 含量は約 1 % であった。4 HB は、2 HB よりもさらに容易にこのポリマー中に取り込まれ、それゆえ、4 HB が 2 g / L で存在した場合、細胞の総ポリマー含量は、それが 5 g / L で存在した場合よりも少ない。MBX184 / pFS30 により生成されたポリマーを細胞から抽出し、分析した。凍結乾燥した細胞塊を 5 mL のクロロホルム中、37℃で 2 時間インキュベートした。細胞の残骸を送心分離 (2000 × g 、5 分) により除去し、得られたポリマー溶液を 50 mL のエタノールに滴下してそれを沈殿させた。この沈殿したポリマーを、上記のよう

にエタノールから遠心分離した。2HB : 4HB比が4 : 1の場合では、このポリマーをエタノールから遠心分離するのは難しく；エタノールに添加した場合、それはもや状のもの（haze）を形成したが、恐らくこのポリマーの分子量がかなり低いため、そのほとんど全てが遠心分離により集められたわけではない。2HB : 4HBが1 : 1のフラスコから単離したポリマーはエタノールから容易に沈殿し、ほぼ完全にそれを回収した。これらの抽出試料のGC分析（表2）は、2HB含量が、細胞全体について分析を行った場合よりも僅かに低いということを示した。ポリマー鎖中の2HB残基が抽出中に加水分解され、それゆえ、抽出試料中の見掛けの2HB含量を低下させるということは可能である。抽出ポリマーの分子量は、2HB含量がより高い場合に、見掛け上低かったという事実が、この説明と一致する。

【 0 0 6 9 】

第2の実験をMBX184 / pFS30で実施した。これらの細胞を、1リットルのエルレンマイヤーフラスコ中の400mL LB-アンピシリン中で、30℃で一晩、200rpmで振盪しながら前培養した。各フラスコへ20mLの培地を加え、その全容量が1リットルあたり；2.5gの追加LB粉末；2g 4HB（ナトリウム塩として）；2g グルコース；50mmol リン酸カリウム（pH7）；100μg アンピシリン；50μmol IPTG；および2、4、6または8g 2HB（ナトリウム塩として）を含むようにした。これらのフラスコを、30℃、200rpmでさらに48時間インキュベートした。これらの細胞を遠心分離（2000×g、10分）により培地から取り出し、水で1回洗浄し、再び遠心分離し、そして凍結乾燥した。この乾燥細胞塊を、上記のようにGC分析に供した。表3は、得られたポリマーの細胞含量および組成を示す。低い2HB : 4HB比では、2HBは、ポリマー中に殆どまたは全く取り込まれなかったが、この比が3 : 1または4 : 1である場合、ポリマー中への2HBの取りこみは非常に顕著であった。すべての細胞の総ポリマー含量は、これらの酸がその摂取および／または取りこみが高率で進行するのを可能にするのに十分に高い濃度で存在しないため、かなり低かった。

【 0 0 7 0 】

(実施例 3 : 組換え E . c o l i . におけるポリ (4 H B - c o - 3 H B) の生成)

M B X 1 1 7 7 / p F S 3 0 株を 4 つの別個の 2 5 0 m l エルレンマイヤーフラスコ中の 1 0 0 m l L B - アンピシリン中で、3 0 ℃で一晩、2 0 0 r p m で振盪しながら前培養した。各フラスコへ 2 0 m l の培地を加え、その全容量が 1 リットルあたり ; 2 . 5 g の追加 L B 粉末 ; 4 g 4 H B (ナトリウム塩として) ; 4 g グルコース ; 5 0 m m o l リン酸カリウム (p H 7) ; 1 0 0 μ g アンピシリン ; 5 0 μ m o l I P T G ; および 0 . 2 5 、 0 . 5 、 0 . 7 5 または 1 g の 3 - ヒドロキシブチレート (3 H B) (ナトリウム塩として) を含むようにした。これらのフラスコを、3 0 ℃、2 0 0 r p m でさらに 4 8 時間インキュベートした。これらの細胞を遠心分離 (2 0 0 0 × g 、 1 0 分) により培地から取り出し、水で 1 回洗浄し、再び遠心分離し、そして凍結乾燥した。ガスクロマトグラフィー分析をこの凍結乾燥した細胞塊について実施し、ポリマー含量および組成について分析した。このポリマー中の 3 - ヒドロキシブチレート単位を試験するのに使用した標準物質はポリ (3 - ヒドロキシブチレート) であった。生成された P H A の細胞含量および組成を表 4 に示した。培地中の 4 H B / 3 H B の比が減少するにつれて、ポリマーの 3 H B 含量は単調な様式で増加し、一方、細胞の総ポリマー含量は全ての試験で同様であった。このことは、総ポリマー収量に有意に影響を与えることなくコポリマー組成を予測可能に制御するのに、培地中の組成を使用し得るということを意味する。ポリマーを凍結乾燥塊の残分から抽出した。全てのサンプルについて凍結乾燥した細胞塊を、その自己の約 3 倍の体積の 1 , 2 - ジクロロエタンと混合し、閉鎖チューブ中で 3 7 ℃で 6 時間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。この微粒子物質を遠心分離 (2 0 0 0 × g 、 1 0 分) によりポリマー溶液から分離した。得られた溶液をその自己の約 1 0 倍の体積のエタノールに滴下し、沈殿ポリマーを溶液から沈殿させた。上清を外へ注ぎ、残りの湿ったポリマーを乾燥するように見えるまで放置し、次いで凍結乾燥して完全に乾燥した。これらの P 4 H B - c o - 3 H B 組成物の熱特性を表 5 に示した。

(実施例 4 : P 4 H B の インビトロおよびインビボ分解)

P 4 H B の分解をインビトロおよびインビボで試験した。様々な多孔性 (0 % 、 5 0 % および 8 0 % 多孔性) の 3 つの異なる配置について調べた。小さなディスク (直径 5 m m) を均一な厚さの圧縮成型 P 4 H B フィルムから穿孔した。P 4 H B の多孔性サンプルを、下記に記載した塩溶出技術を使用して生成した。これらのディスクを滅菌したリン酸緩衝液 (8 m M リン酸ナトリウム、2 m M リン酸カリウム、140 m M N a C l 、10 m M K C l 、p H 7 . 4 、保存剤として N a N₃ を含有) 中、37℃でインキュベートすることにより、インビトロでの分解挙動について試験した。ラットの皮下ポケットに移植後、インビボでの分解挙動について試験した。

【 0 0 7 2 】

(多孔性 P 4 H B の調製)

区分された塩化ナトリウム結晶 (8 0 ~ 1 8 0 μ m) を溶融した P 4 H B と混合した。このポリマー塩比を調整して所望の多孔性を生成し得、一方、粒子サイズを調整して種々のサイズの孔を生成し得る。このポリマー塩混合物をプレスして薄膜とした。この物質を固化させた後、マイラーバックングから取り出した。このフィルムを徹底的に水で抽出して塩を除去すると、P 4 H B の多孔性フィルムを残した。

【 0 0 7 3 】

(P 4 H B の加速分解)

P 4 H B の分解をインビボで試験した。様々な多孔性 (0 % 、 5 0 % および 8 0 % 多孔性) の 3 つの異なる配置について調べた。小さなディスク (直径 5 m m) を均一な厚さの圧縮成型 P 4 H B フィルムから穿孔した。P 4 H B の多孔性サンプルを、塩溶出技術を使用して生成した。ラットの皮下ポケットに移植後、インビボでの分解挙動について試験した。サンプルを種々の時間で取り出した。この分子量を G P C により測定し、質量の損失を C G 分析による残りの 4 H B の定量化により測定した。結果を図 3 に示した。図 3 に示したように、サンプルの質量損失は多孔性に応じて変化した。フィルム、50%および80%多孔性サンプルは、6週の間隔に亘ってそれぞれ5%、20%および75%質量損失を示し、

一方、これらのサンプルの平均分子量損失はまた有意に（20～50％）減少した。これらのデータは、PHAの分解速度が、多孔性を変化させそして表面積を増加させることにより、改変しそして制御し得るということを立証する。

【 0 0 7 4 】

（結果）

P4HB移植片は、PGA不織メッシュに対するよりも非常に少ないごく最小量の炎症応答を示した。このことは、これらの物質の生体適合性の大変良い指標である。サンプルを種々の時間で取り出し、移植片および周囲の組織の両方について組織学的に評価した。この分子量をGPCにより測定し、質量の損失をGC分析による残りの4HBの定量化により測定した。結果を表6および7に示した。表6に示したように、P4HBはインビトロでは10週の期間に亘って有意に分解しなかった。全てのサンプルはそれらの当初の重量を維持し、約20～40％の平均分子量の減少があった。インビボでインキュベートされたサンプルは、さらにより顕著な分解を示した。質量損失は多孔性に依拠して変化した。フィルム、50％および80％多孔性サンプルは、10週の期間に亘ってそれぞれ20％、50％および100％質量損失を示し、一方、これらのサンプルの平均分子量損失はまた有意に（20～50％）減少した。

【 0 0 7 5 】

これらのサンプルの光学顕微鏡および環境走査型電子顕微鏡（ESEM）検査は、10週のインキュベーション期間に亘ってインビトロサンプルに関して識別し得る変化をほとんど示さない。他方では、インビボの移植片は明瞭な分解の徴候を示した。これらの物質の表面は、10週の移植期間中、漸次分解した。1週後、フィルムサンプルは多少の割れおよびクレージング（crazing）を示し、これは、続く9週間に亘って表面侵食およびくぼみに進展する。

【 0 0 7 6 】

インビトロの分解データは、P4HBが単純な加水分解に対してかなり安定であり、生体再吸収性適用（例えば、PGA、PLAおよびそれらのコポリマー）に使用される他のポリエステルとは異なるということを示唆する。しかしながら、これら移植片の分解は、P4HBがインビボで分解し得、生物学的に媒介する

様式での分解を示唆する。このデータは、多孔性が増加するに応じて分解が増加するということを示し、これはポリマー移植片の表面積がそのインピボでの分解にひとつの役割を果たすということを示唆する。このことは、P4HBポリマーにインピボでの分解が移植片の表面で起こり、移植片全体にわたって加水分解により分解し、関連する分子量減少および機械的特性の損失を伴うPGAまたはPLAとは異なるということを示唆する。これらのデータは、P4HBの分解速度がその表面積を変化させることにより、改変しそして制御し得るということを示唆する。この型の表面分解が比較的緩やかな速度の分子量損失となり、現存する吸収性医療用ポリエステルよりもポリマー材料の特性のより長期にわたる維持を可能とするということがまた期待される。このP4HB移植片は非常に良好な耐容性を示し、ごく最小量の異物反応しか示さなかった。これらの知見は、これらの材料が現存する生体医用ポリエステルに対して有意な利点を有することを示す。

【 0 0 7 7 】

(実施例 5 : 圧縮成型)

Carver水圧プレスを使用してP4HBを薄膜にプレスした。この圧盤を115℃まで加熱した。金属スペーサーを使用する2枚のマイラーの間にP4HBをプレスした。スペーサーの厚さおよびプレスの圧力を調整してフィルム厚を制御し得る。このフィルムをプレスから取りだし、室温まで冷却させた。固化した後（およそ数秒以内）、このフィルムはマイラーバックリング物質から容易にはがれた。この物質に関する機械的データを表1に示す。P4HBの迅速な凝固は、その迅速な結晶化を立証する。

【 0 0 7 8 】

(実施例 6 : 多孔性 P 4 H B の圧縮成型)

実施例 4 および 5 に記載したように、区分された塩化ナトリウム結晶（80～180 μm ）を熔融したP4HBと混合した。このポリマー塩比を調整して所望の多孔性を生成し得、一方、粒子サイズを調整して種々のサイズの孔を生成し得る。実施例 6 に記載した条件を使用して、このポリマー塩混合物をプレスして薄膜とした。この物質を固化させた後、フィルムをマイラーバックリングから取り出

した。このフィルムを徹底的に水で抽出して塩を除去すると、P4HBの多孔性フィルムを残した。塩の除去を上清の塩化物の分析によりモニターし、溶出したフィルムの元素分析により確かめた（0.5%より少ない塩化物）。50%および80%多孔性P4HB（それぞれ、pP4HB50およびpP4HB80）に関する機械的データを表1に示す。

【0079】

（実施例7：P4HB骨格の細胞播種）

多孔性P4HB（実施例6に記載したような）を冷エチレンオキシド処理により滅菌した。ヒツジの血管細胞を播種し、インビトロで培養した。予備的なデータは、これらの細胞のこの物質への非常に良好な付着を示した。これは、この物質の生体適合性のさらなる証明である。この物質に付着した細胞数をDNAに対するアッセイを使用して定量化し得、そして組織工学骨格、PGAメッシュに対するスタンダードと比較し得る。

【0080】

（実施例8：繊維配向）

P4HBの圧縮成型小片を一軸性に延伸した。このサンプルは細くなり、かつ透明となり、ネッキングの徴候を示した。この延伸プロセスの後、このポリマーはより丈夫にそして幾分かより柔軟になり、このサンプルの1軸性配向を立証した。

【0081】

（実施例9：P4HB発泡体の生成のための熱的相分離方法）

P4HBをジオキサン中に1～5重量/体積%で溶解した。このポリマー溶液を薄膜としてキャストし、ジオキサンの融点未満に氷冷することにより固化させた。溶媒を低い圧力でこの固体物質からエバポレートし、開始時の膜厚のおよその寸法を有する多孔性発泡体を生成した。この物質のESM分析は高度な多孔性、スポンジ様構造を示した。このポリマー濃度および冷却プロセスは、この発泡体の多孔性を改変するため変化し得る。冷凍する前に、このポリマー溶液は種々の形態の形となり得、特定の材料に細分化し得、またはコーティングとして使用し得る。それゆえ、この熱的相分離技術は、非常に種々の高度に多孔性の3次

元形状のP4HBを生成するのに使用し得る。

【 0 0 8 2 】

(実施例 1 0 : P G A 不織メッシュの P 4 H B コーティング)

P 4 H B をテトラヒドロフラン中に 1 重量 / 体積 % で溶解した。1 mm 厚の不織メッシュの P G A (A l b a n y I n t e r n a t i o n a l 、バルク密度 5 2 m g / c c) を、気泡が排除されるようにこの溶液に浸漬した。このコーティングメッシュを風乾させ、そしてこのコーティング手順を繰り返した。このコーティングメッシュの光学顕微鏡および E S E M 分析は、この乾燥プロセス中にこのポリマーが繊維の交点に移動し、繊維を一緒に結合するよう機能することを示した。この繊維結合技術が P G A メッシュの強度および取り扱い性を劇的に改善することを見出した。A S T M D 6 3 8 に従った引っ張り試験は、この物質の引っ張り強さ、ヤング率および極限伸びが 1 3 0 p s i 、 2 4 0 p s i および 1 7 1 % であることを示した。これは、これらのパラメータを試験するにはあまりにもろかった非コーティング物質に対する劇的な改善である。

【 0 0 8 3 】

(実施例 1 1 : P G A 不織メッシュの P 4 H B 発泡体コーティング)

P 4 H B をジオキサン中に 2 . 5 重量 / 体積 % で溶解した。1 mm 厚の不織メッシュの P G A (A l b a n y I n t e r n a t i o n a l 、バルク密度 5 2 m g / c c) を、気泡が排除されるようにこの溶液に浸漬した。このコーティングメッシュを、コーティング溶液が固化するように氷冷した。このメッシュを凍結乾燥し、ジオキサンを除去した。このコーティングメッシュの光学顕微鏡分析は、この凍結乾燥プロセス中に、このポリマーが P G A メッシュ全体を通して繊維物様発泡体を形成することを示した。この発泡体物質は良好な取り扱い性を有する。この高い表面積および改善した機械的特性は、種々の用途に魅力的である。

【 0 0 8 4 】

(実施例 1 2 : P 4 H B ミクロスフェアの形成)

P 4 H B をジクロロメタン中に 1 重量 / 体積 % で溶解した。この溶液の 1 m l 体積を、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) の 0 . 5 重量 / 体積 % 溶液の 5 m l と混合した。この二相混合物を機械的に混合してエマルジョンを生成した。ジク

ロロメタンの除去を容易とするため早く攪拌しながら、窒素気流をこの混合物を通して1時間泡立てた。この混合物を一晩空気に開放したまま攪拌し、ジクロロメタンを完全に除去した。位相差光学顕微鏡下でこれを測定すると得られた懸濁物は、約1～10 μ mのP4HBミクロスフェアを含有した。

【0085】

(要約)

ホモポリマーP4HBおよび4HBを含有するコポリマーのようなポリヒドロキシアルカノエートは、それらを医療用途に使用するための移植片として非常に魅力的とする物理的性質および分解特性を有する。これらのポリマーは、それらを移植可能な医療用材料として使用するための繊維、シート、発泡体、コーティング、構造体、フィラメントなどに製造され得る。

【0086】

【表1】

表1. 選抜医療用ポリマーの熱的および機械的特性

ポリマー	T _m (°C)	T _g (°C)	引張り 強さ(psi)	モジュラス (psi)	伸び ^a (%)	分解
¹ P4HB	60	-51	7,500	9,400	1000	配置に依存
¹ pP4HB50 ^a	60	-51	895	2155	164	配置に依存
¹ pP4HB80 ^b	60	-51	180	257	100	配置に依存
⁶ P4HB-3HB 10%	50	-42	9,000	14,500	1080	報告なし
¹ PHB	175	0	4,000	110,000	4	>32 週
² PGA	230	35	10,000	1,000,000	17	8 週
² PDLLA	Am	53	5,000	300,000	5	<8 週
² PLLA	175	55	10,000	500,000	8	>8 週
² DLPLG 50/50	Am	48	7,000	300,000	5	3-8 週
¹ LDPE			2,000		400-700	非分解性
¹ HDPE			4,000		100-1000	非分解性
¹ UHMWPE			7,250		450	非分解性
PP			4,000	20,000	200-700	非分解性
PET			8,500		50	非分解性
PTFE			3,000	50,000	300	非分解性

降伏にて

^a pP4HB50, 50%多孔性P4HB, 実施例7を参照
^b pP4HB80, 80%多孔性P4HB, 実施例7を参照

参考：1. この研究からASTMD638に従って周囲温度および0.05または0.1インチ/分のひずみ速度で測定した。2. Hutmacherら、In

t. J. Oral Max. Imp. 1996, 11, 667~678. 3. Nobesら、投稿中。4. Mark, Physical Properties of Polymers Handbook, American Inst. of Physics, Woodbury, New York, 1996. 5. Schwartz, S. SおよびGoodman, S. H. Plastic Materials and Processes, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1982. 6. Saito, YおよびDoi, Y. Int. J. Biol. Macromol. (1994) 16: 99-104.

[0 0 8 7]

【表 2】

表 2. MBX1177/pFS30 および MBX184/pFS30 由来のポリ(4HB-co-2HB)のGC分析

株	4HB, g/L	2HB, g/L	総 PHA, dcw ^a %	P4HB, PHA ^b %	P2HB, PHA ^b %
184/30	2	8	18.3	70.8	19.2 (14.2) ^c
184/30	5	5	47.1	98.8	1.2 (0.9) ^c
1177/30	2	8	13.0	62.3	27.7
1177/30	5	5	40.1	98.9	1.1

^a dcw : 乾燥細胞重量

^b GC分析により決定。約20mgの凍結乾燥細胞質量を、90体積%1-ブタノールおよび10体積%濃塩酸を含む混合物の2mL中で110℃で3時間、ブタノリシスに供し、内部標準として2mg/mLの安息香酸を添加した。得られた混合物の水溶性成分を3mLの水で抽出することにより除去した。有機相（全体を通じて流速2mL/分、1:50のスプリット比で1μL）を、次の温度プロフィール（80℃、2分；250℃まで10℃/分；250℃、2分）でSPB-1融解シリカキャピラリGCカラム（30m；0.32mmID；0.25μmフィルム；Sul pel co；Bul le f o n t e、P a .）により分析した。ポリマー中の4-ヒドロキシブチレート単位の存在を試験するために使用

した標準物質は γ -ブチロラクトンであった。ポリマー中の2-ヒドロキシブチレート単位を試験するために使用した標準物質は2-ヒドロキシ酪酸ナトリウムであった。

括弧内のパーセントは、ポリマーのクロロホルム中への抽出、続いてエタノール中での沈殿後、上記のようにGC分析により決定した。

[0 0 8 8]

【表 3】

表 3. MBX184/pFS30由来のポリ(4HB-co-2HB)のGC分析

サンプル	4HB, g/L	2HB, g/L	総PHA, dcw ^a %	P4HB, PHA ^b %	P2HB, PHA ^b %
1	2	2	8.2	100	0
2	2	4	5.6	100	0
3	2	6	5.7	84.1	15.9
4	2	8	4.1	54.3	45.7

^a d c w : 乾燥細胞重量

^b GC分析により決定。詳細については表2を参照のこと。

[0 0 8 9]

【表 4】

表 4. MBX1177/pFS30由来のポリ(4HB-co-3HB)のGC分析

サンプル	4HB, g/L	3HB, g/L	Total PHA, dcw ^a %	P4HB, PHA ^b %	P3HB, PHA ^b %
3a	4	0.25	49.3	98.0	2.0
3b	4	0.5	46.7	94.2	5.8
3c	4	0.75	56.6	91.7	8.3
3d	4	1	51.8	89.4	10.6

^a d c w : 乾燥細胞重量

^b GC分析により決定。詳細については表2を参照のこと。ポリマー中の4-ヒドロキシブチレート単位の存在を試験するために使用した標準物質は γ -ブチロラクトンであった。ポリマー中の3-ヒドロキシブチレート単位を試験するために使用した標準物質はポリ(3-ヒドロキシブチレート)であった。

[0 0 9 0]

【表5】

表5. MBX1177/pFS30由来のP4HBおよびP4HB-co-3HBの性質

サンプル	% ^a 4HB	% ^a 3HB	Tm ^b (°C)	dHTm1 ^b (J/g)	Tg ^b (°C)	Tx ^b (°C)	Tm2 ^b (°C)	Mw ^c
P4HB	100	0	60	45	-51	-16	X	1,000,000
3b	94.2	5.8	47	36	-52	-4	44	1,500,000
3c	91.7	8.3	40	20	-53	nd	39	1,900,000
3d	89.4	10.6	39	17	-53	nd	nd	1,100,000

nd - 検出せず

^a G C 分析により決定。詳細については表2を参照のこと。

^b D S C 分析により決定。P e r k i n E l m e r P y r i s 1 示差走査熱分析計を使用した。サンプル量は約4～8mgであった。使用した熱プログラムは以下の通りであった：25℃、2分；195℃まで10℃/分で昇温；195℃で2分間、保持；300℃/分で-80℃まで昇温；-80℃で2分間保持；10℃/分で195℃まで昇温。融解温度（Tm）およびこの融解ピークの融解エンタルピー（dHTm1）を第一加熱サイクルで決定した。ガラス転移温度（Tg）、結晶化温度（Tx）および融解温度（Tm2）を第二加熱サイクル中に決定した。

^c G P C 分析により決定。単離ポリマーをクロロホルム中に約1mg/mLで溶解し、サンプル（50μL）を、クロロホルム1mL/分の流速で、室温で屈折率検出器を使用するW a t e r s S t r y a g e l H T 6 E カラムにクロマトグラフした。分子量を、狭い多分散性のポリスチレン標準物質と比較して決定した。

【0091】

表6：P4HBのインビトロでの分解。リン酸緩衝液（8mMリン酸ナトリウム、2mMリン酸カリウム、140mM NaCl、10mM KCl、pH7.4、保存剤としてNaN₃を含有）中、37℃でインキュベートしたP4HBのフィルム、50%多孔性および80%多孔性サンプルの残存原型質量%および分子量

【0092】

【表 6】

移植 (週)	フィルム残存 重量% ^a	フィルム 分子量 ^b	50%多孔性 残存重量% ^a	50%多孔性 分子量 ^b	80%多孔性 残存重量% ^a	80%多孔性 分子量 ^b
0	108	1144592	96	963145	123	1291117
1	97	1160707	93	1103860	99	968245
2	101	1008496	98	1055614	106	1072328
4	100	887005	96	725089	116	987665
6	109	896521	97	764260	95	1049079
10	92	772485	90	605608	100	727543

^a G P C 分析により決定。詳細については表 3 を参照のこと。

^b 定量的 G C 分析により決定。詳細については表 2 を参照のこと。

【 0 0 9 3 】

表 7 : P 4 H B のインビボでの分解。ラットの皮下に移植した P 4 H B のフィルム、50%多孔性および80%多孔性サンプルの残存原型質量%および分子量

【 0 0 9 4 】

【表 7】

移植 (週)	フィルム 残存重量% ^a	フィルム 分子量 ^b	50%多孔性 残存重量% ^a	50%多孔性 分子量 ^b	80%多孔性 残存重量% ^a	80%多孔性 分子量 ^b
0	108	1144592	96	963145	123	1291117
1	103	1091107	109	1026821	88	1132492
2	95	1054873	94	973830	35	943960
4	92	1007736	73	989629	39	881919
6	90	797170	74	901330	28	689157
10	80	716296	48	647175	0	N/D

N / D 検出せず

^a G P C 分析により決定。詳細については表 3 を参照のこと。

^b G C 分析により決定。詳細については表 2 を参照のこと。外植片は、しばしば付着性組織または凝固した血液の存在のため原型移植片よりも重かった。従って、外植片における P 4 H B の質量は定量的 G C 分析により決定した。P 4 H B の残存重量%を、この重量の原型移植片による除算として求めた。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1は、ペンダント基の長さおよび個々の生合成経路に従って、広く群に分けたPHAバイオポリマーの概略図である。

【図2A】

図2Aは、短いペンダント基のPHAを導く経路の概略図である。

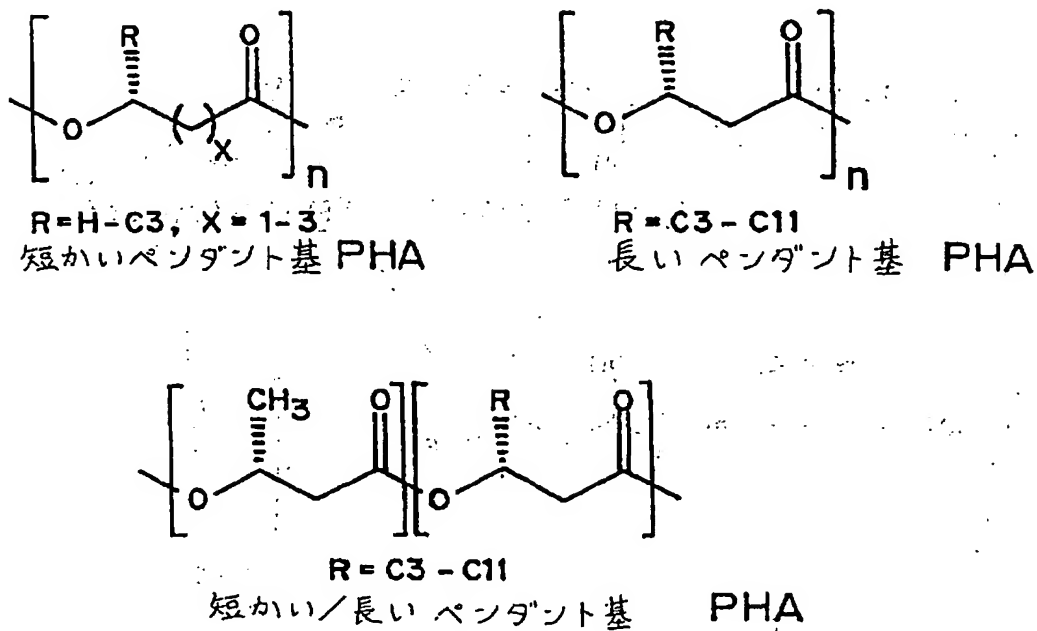
【図2B】

図2Bは、長いペンダント基のPHAを導く経路の概略図である。

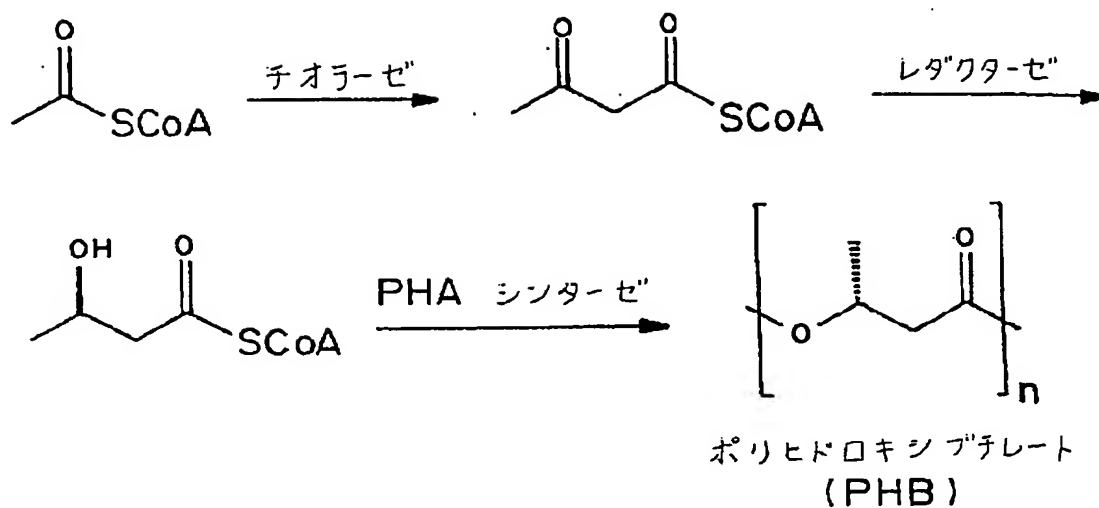
【図3】

図3は、インビボでの経時的（数週間）なP4HB分解のグラフである。

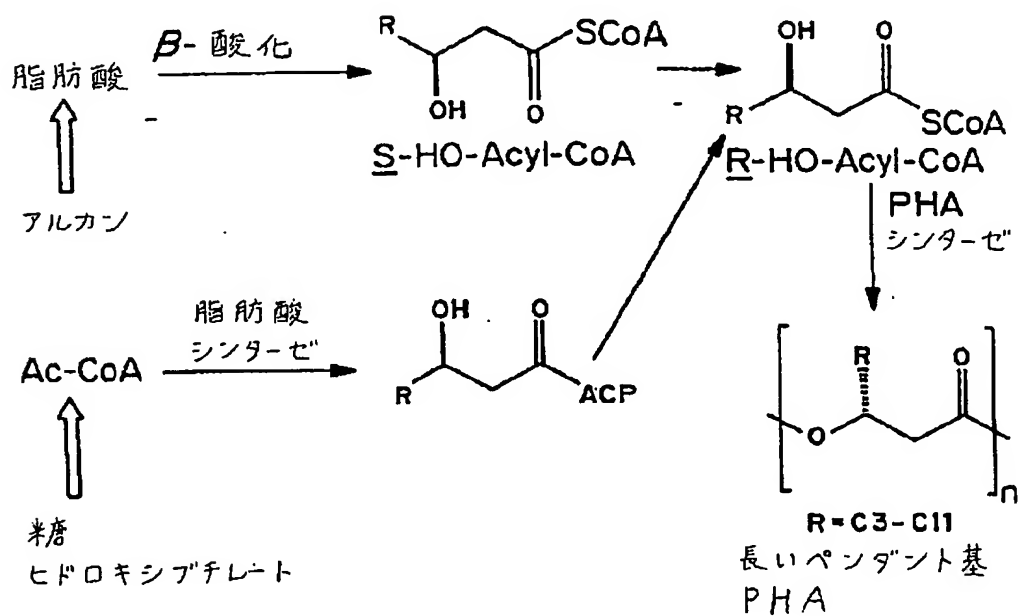
【図1】



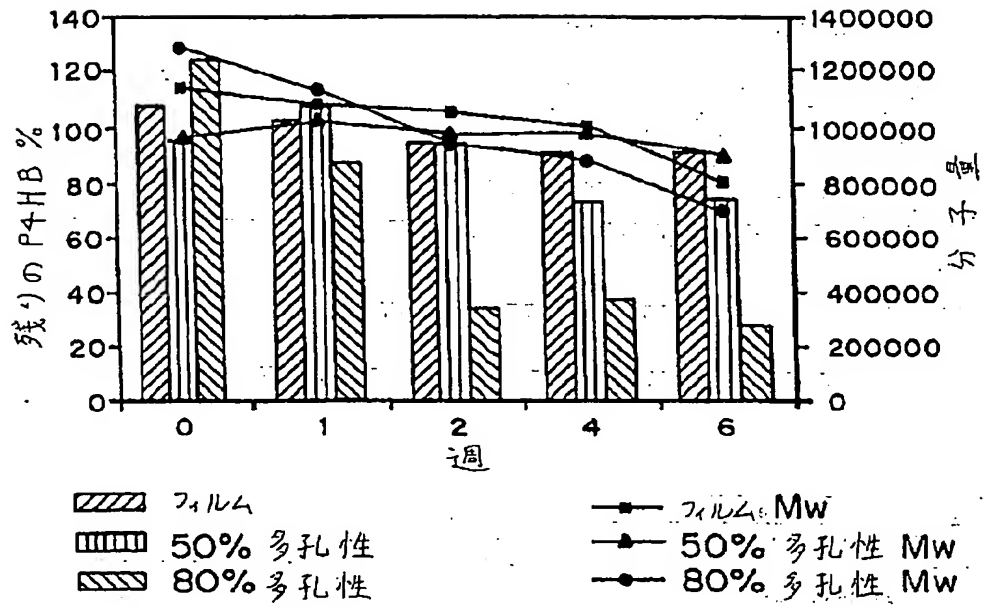
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No PCT/US 98/27355				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 6	C08G63/06	C08G63/91	C08K3/00	C08K5/00
	C08J9/28	C08L67/04	C12P7/62	A61K47/34
	A61L25/00	A61L27/00	A61L31/00	C08J9/26
				A61L17/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC 6	C08G	C08K	C08J	C12P A61L A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages			Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9252 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 92-429826 XP002101841 & JP 04 326932 A (NIPPON ZEON KK) , 16 November 1992 see abstract			1-3,5-7, 31-33,38
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9310 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 93-079450 XP002101842 & JP 05 023189 A (MITSUBISHI KASEI CORP) , 2 February 1993 see abstract			1-3,5-7, 25-28, 33-35
-/-				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) of which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report	
4 May 1999			21/05/1999	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 spo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Krische, D	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 98/27355

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 39 37 649 A (BOEHRINGER INGELHEIM KG) 16 May 1991	1-3,5-7, 25-27, 33-35,37 19-21
Y	see claims 1,5,6,17; examples 2,4,5 see column 4, line 31 - line 49 ---	
Y	A. KISHIDA ET AL.: CHEM. PHARM. BULL., vol. 37, no. 7, 1989, pages 1954-1956, XP002101838 see the whole document ---	19-21
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9551 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A23, AN 95-399485 XP002101843 & JP 07 275344 A (NIPPON ZEON KK) , 24 October 1995	1-3,5-7, 25,31-34
Y	see abstract ---	19-22,24
Y	WO 93 20134 A (ALZA CORP) 14 October 1993 see abstract; claim 1 see page 1, line 16 - line 22 see page 10, line 19 - page 11, line 30 ---	19-22,24
X	LEE C W ET AL: "COPOLYMERIZATION OF GAMMA-BUTYROLACTONE AND BETA-BUTYROLACTONE" MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS, vol. 198, no. 4, 1 April 1997, pages 1109-1120, XP000677489 see page 1109 see page 1113 - page 1114 ---	1-3,5-7, 26,30
X	Y. SAITO ET AL.: INT. J. BIOL. MACROMOL., vol. 16, no. 2, 1994, pages 99-104, XP002101839 cited in the application see the whole document ---	1-3,5-7, 26-28
X	S. HEIN ET AL: "Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of Escherichia coli" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 153, no. 13, 5 August 1997, pages 411-418, XP002097027 cited in the application see the whole document ---	1-3,5-7, 26-29
X	EP 0 601 885 A (TAKASAGO INTERNATIONAL CORP.) 15 June 1994 see abstract; examples 6-8 ---	1-3, 5-11,26, 27,30

3

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/US 98/27355

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRONOBU FUKUZAKI ET AL: "DIRECT COPOLYMERIZATION OF L-LACTIC ACID WITH Y-BUTYROLACTONE IN THE ABSENCE OF CATALYSTS" DIE MAKROMOLEKULARE CHEMIE, vol. 190, no. 7, 1 July 1989, pages 1553-1559, XP000104037 see page 1553 see page 1558	1-3, 5-10, 26, 27, 30
X	US 3 982 543 A (SCHMITT, EDWARD EMIL ET AL) 28 September 1976 see abstract; example 6 see column 9, line 35 - column 12, line 5	1-3, 5-9, 11, 25-27, 30-35, 37, 38
X	EP 0 423 484 A (BTF BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH) 24 April 1991 see abstract; example 6 see page 2, line 9 - line 15	1, 19-21, 25, 26, 31-33
X	EP 0 754 467 A (ASTRA AB) 22 January 1997 cited in the application see abstract; example 1 see column 3, line 35 - line 49	1, 19-22, 24-26, 31-34, 38
X	C.W. POUTON ET AL.: ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 18, 1996, pages 133-162, XP002101840 cited in the application see page 145 - page 150	1, 19-21
P, X	WO 98 51812 A (METABOLIX INC) 19 November 1998 cited in the application see claims 1, 3, 8-11, 41-57; examples 15, 20 see page 8, line 21 - page 15, line 22 see page 18, line 20 - page 26, line 21	1-3, 5-10, 14-22, 24-27, 29-39
A	WO 94 06866 A (BIOPAK TECHNOLOGY LTD) 31 March 1994 see claims 1, 2 see page 19, line 6 - page 25, line 11 see page 29, line 7 - page 30, line 22 see page 32, line 6 - page 39, line 21	1-3, 5-7, 19-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members				Inter. Appl. Application No PCT/US 98/27355	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 3937649	A	16-05-1991	EP 0432443 A		19-06-1991
			JP 3187386 A		15-08-1991
WO 9320134	A	14-10-1993	AU 3941793 A		08-11-1993
			EP 0633907 A		18-01-1995
			MX 9301821 A		31-03-1994
			US 5571525 A		05-11-1996
			ZA 9302273 A		26-11-1993
EP 0601885	A	15-06-1994	DE 69318946 D		09-07-1998
			DE 69318946 T		17-12-1998
			JP 6329768 A		29-11-1994
			US 5516883 A		14-05-1996
US 3982543	A	28-09-1976	US 3867190 A		18-02-1975
EP 0423484	A	24-04-1991	AU 632370 B		24-12-1992
			AU 6379690 A		18-04-1991
			CA 2025453 A		17-04-1991
			DE 59003337 D		09-12-1993
			JP 3133922 A		07-06-1991
			US 5128144 A		07-07-1992
EP 0754467	A	22-01-1997	AT 171076 T		15-10-1998
			AU 636570 B		06-05-1993
			AU 3843889 A		23-01-1990
			DE 68928817 D		22-10-1998
			DE 68928817 T		08-04-1999
			DK 46690 A		22-02-1990
			EP 0349505 A		03-01-1990
			ES 2121741 T		16-12-1998
			FI 963506 A		06-09-1996
			IL 90714 A		24-06-1994
			JP 2842649 B		06-01-1999
			JP 3500139 T		17-01-1991
			KR 131012 B		14-04-1998
			NO 302999 B		18-05-1998
			WO 9000067 A		11-01-1990
			US 5641505 A		24-06-1997
WO 9851812	A	19-11-1998	AU 7486798 A		08-12-1998
WO 9406866	A	31-03-1994	AU 4923793 A		12-04-1994
			CA 2144310 A		31-03-1994
			EP 0662107 A		12-07-1995
			MX 9305814 A		29-04-1994
			US 5767222 A		16-06-1998
			US 5556895 A		17-09-1996
			US 5801223 A		01-09-1998

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ¹	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
A 6 1 L 31/00		C 0 8 J 9/26	CFD 4 J 0 2 9
C 0 8 J 9/26	CFD	9/28	Z B P 4 L 0 3 3
9/28	Z B P		
C 0 8 L 67/04		C 0 8 L 67/04	
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	
D 0 6 M 15/507		A 6 1 L 25/00	K
		D 0 6 M 15/507	Z

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 ウィリアムズ, サイモン エフ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 01770, シャーボーン, ディアフィー
 ルド ロード 26

Fターム(参考) 4B064 AD83 CA02 CA19 CC24 DA16
4C076 AA29 AA71 BB31 BB32 CC19
CC50 EE24 FF02 FF06
4C081 AA02 AA12 AA14 AB11 AC02
AC03 BA16 BB08 CA171
CC01 CD34 CE01 CE02 CE11
CF21 DA01 DA02 DA04 DA05
DA11 DB02 DB03 EA02 EA03
EA06 EA14 EA15
4F074 AA68 AC22 AC24 AD09 AD10
AD13 BA02 BA03 BA04 CB03
CB14 CB18 DA24 DA53
4J002 AB053 AD013 AD032 AD033
CF003 CF181 DE106 DE226
DE236 DE246 DF006 DF007
DG046 EF036 EF096 EG027
EG077 EH037 EH116 EN106
FD027 FD310 GB00 GB01
4J029 AA02 AB07 AC01 AE06 EA02
EA03 EA05 EF01 FC02 FC07
HA01 HB01 JA063 JA093
JA123 JA173 JA203 JB163
JB173 JB183 JC073 JE163
JE243 KD17 KH01 KH08
KJ08
4L033 AB07 AC10 AC15 CA45

This Page Blank (uspto)